

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-273888

(43) 公開日 平成4年(1992)9月30日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 13/04		7822-4C		
A 2 3 L 3/3436		2114-4B		
C 0 9 K 15/08		6917-4H		
C 1 2 P 19/12		8214-4B		
		7236-4B	C 1 2 N 5/00	F
審査請求 未請求 請求項の数4(全 15 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平3-115714

(22) 出願日 平成3年(1991)2月27日

(71) 出願人 000001199

株式会社神戸製鋼所

兵庫県神戸市中央区脇浜町1丁目3番18号

(72) 発明者 三村 精男

静岡県富士市宮下435-7

(72) 発明者 竹林 恵一

茨城県つくば市春日 2-18-5

(72) 発明者 高原 義昌

千葉県習志野市谷津5-29-8

(72) 発明者 大澤 俊彦

愛知県春日井市押沢台7丁目9-8

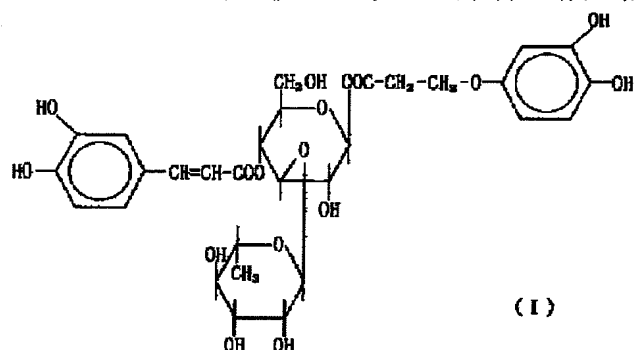
(74) 代理人 弁理士 戸田 親男

(54) 【発明の名称】 新規抗酸化性配糖体、その製法及び用途

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 ごま (Sesamum indicum) の植\*

\* 物成体から誘導した細胞を培養し、その培養培地から分取した、式 (I) を有する配糖体



【効果】 すぐれた抗酸化作用を示し、食品、医薬品、

化粧品などに応用できる。

1

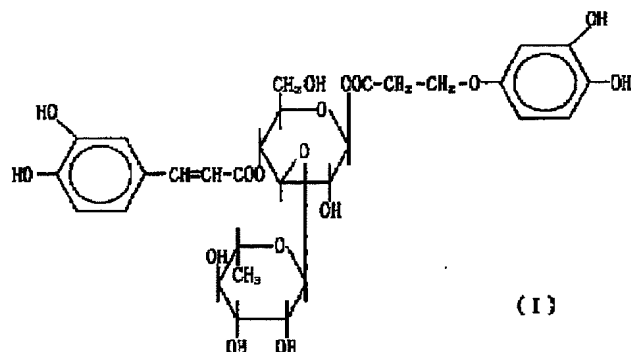
2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の

\* 【化1】で示される構造式(Ⅰ)を有する配糖体。

\* 【化1】



(Ⅰ)

【請求項2】 ごま (*Sesamum indicum* L.) の植物成体から誘導した増殖性細胞を培地に培養し、その培養物から、構造式(Ⅰ)を有する配糖体を製造する方法。

【請求項3】 ごま (*Sesamum indicum* L.) の植物成体から誘導した高温培養細胞を培地に培養し、その培養物から構造式(Ⅰ)を有する配糖体を製造する方法。

【請求項4】 構造式(Ⅰ)で示される配糖体を有効成分とする抗酸化剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、植物由来の有用物質に関するものであり、更に詳細には、ごま (*Sesamum indicum* L.) の植物体より人工的に誘導した細胞(カルス)の大量培養法によって、配糖体化合物を工業的に大量に製造する技術に関するものである。

【0002】本発明に係る配糖体は、従来未知の天然物起源の新規化合物でありしかも強力な抗酸化活性を有するので、本発明は食品産業のほか、医薬品産業及び化粧品産業等に広く応用されるものである。

【0003】また、本発明に係る配糖体は、その化学構造が明らかとなっているので、これを化学修飾したり変形したりすることにより新規誘導体の開発が可能となり、新規な抗酸化性物質の出現も大いに期待することができる。そのうえ、化学合成による該配糖体の製造法の開発も期待することが可能となるので、該配糖体を更に工業的に大量に生産することも可能となり、これらの面での本発明の利用性も顕著なものがある。

【0004】

【従来の技術】我々人間を初め地球上の多くの生物にとって、酸素は不可欠である。しかし、最近、生体内における過剰量の酸素はラジカルや過酸化脂質を生成し、その結果各種組織が障害を受けることが問題となっている。この障害は動脈硬化、肝疾患、網膜症、炎症などの病因となることが明らかになっており、さらに老化や発癌との関連も示されている。

【0005】脂質が過酸化される例として、生体の重要な構成成分であると共に、必須脂肪酸として不可欠な食品成分である多価不飽和脂肪酸(PUFA)は、図1で示される第1図に示すような自動酸化と呼ばれるラジカル連鎖反応を引き起こし、過酸化脂質やマロンジアルデヒド(MDA)が初めとする酸化分解物を生成することが知られている(大澤・並木「現代の食品化学」三共出版p.186)。

【0006】一方、このような脂質の酸化的劣化を防止するために、食品系では冷凍保蔵や包装、脱酸素剤の使用などの物理的手段と共に、抗酸化剤の添加という化学的手段と共に、抗酸化剤の添加という化学的手段が一般的である。特にBHA(ブチルヒドロキシアニソール)やBHT(ブチルヒドロキシトルエン)を初めとする合成抗酸化剤が長く使用されてきたが、最近に至って安全性の面から食品への使用が再検討されつつある。

【0007】そこで、その需要が急増してきたのは天然ビタミンEであるが、価格や効果の点から更に有効で安全な天然抗酸化性物質の開発が要望されているのが現状である。さらに、天然抗酸化性物質の積極的な摂取により生体内のラジカル生成や脂質過酸化反応を抑制し、その結果、老化や発癌を初めとするさまざまな疾患を防止し得ると考えられている(大澤「食品の健全性と食品成分の生理機構」佐詰技術研究会p.2)。

【0008】こうした天然由来の抗酸化性物質や食品や医薬品、化粧品などに適宜使用するためには、従来とは性質の異なった天然抗酸化性物質を見出し、それぞれの特徴を発揮する条件で活用することが重要である。

【0009】天然系物質の内、例えば植物由来の香辛料等には、抗酸化活性をもった種々の化合物が含まれており(図2)、香辛料は食品保存作用を持つものとしても食品に添加されてきた。しかしながら香辛料には、強い香や色を示すものが多く、こうした性質はこれらを食品、医薬品、化粧品などに応用する場合に使用範囲を大幅に限定してしまう。

【0010】実用例の代表としては、化学合成法によるビタミンCおよび天然物から抽出精製されているビタミン

ンEが挙げられている。この内、ビタミンCは水溶性の物質であるため、油や生体内の脂質には溶けない。一方、ビタミンEは脂溶性であるため、血液などの水溶液には溶けず生体内の脂質に蓄積される特徴が認められている。こうした極端な水溶性や脂溶性の性質は、生体に応用する食品、医薬品、化粧品などの場合、必ずしも有利な性質とは考えられておらず、生体内の脂質と水溶液のいずれにおいても適宜、抗酸化活性を発揮するためには、水溶性と脂溶性の両方の性質をもつ天然化合物が有利である。

【0011】本発明は、このような天然植物の内、特にごまに着目し、黒ごま (*Sesamum indicum* L.) の植物成体より誘導して得られた増殖性細胞を培養し、その培養物から構造式 (I) で示される配糖体化合物を得、これらの化合物に強力な抗酸化活性を認めたものであるが、構造式 (I) で示される化合物は、図3で示されるごまの種子から単離された代表的なリグナン系化合物とは全く異なっており、新規化合物である。

【0012】さらに、ごま培養細胞より生成される本発明に係る新規抗酸化配糖体は、カフェ酸をアグリコンとし、六単糖をほぼ中心に配糖化した構造をとっていることにより水溶性と脂溶性の中間的な極性を示すものである。こうした性質は、さまざまな生理作用が期待される抗酸化性物質の食品、医薬品、化粧品などへの応用に非常に有利であり、他の抗酸化性物質には全く見当らない。

【0013】また、本発明は、植物体自体から抽出するものではなく、抗酸化性配糖体を生産する培養細胞を用いるものであって、ごま細胞を大量培養することにより天然の抗酸化性配糖体を工業的に大量生産することに成功したものであって、この点においても新規である。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】化学工業の発展を背景として、合成抗酸化剤、例えばブチルヒドロキシアニソール (BHA) やブチルヒドロキシトルエン (BHT) \*

\*などが一般的に使用されてきた。ところが、こうした合成抗酸化剤の使用が増えるにつれて、食品公害が増加して安全性の面から大きな問題が生じ、消費者の合成抗酸化剤に対する拒否反応が強くなり、その使用量も低下しているのが現状である。

【0015】したがって安全性の高い、天然由来の抗酸化性物質は、生体内における抗酸化的な生体の防御機構を支援する物質として、食品、特に機能性食品、健康食品や栄養食品のほか、医薬品や化粧品の技術分野において非常に期待されている。

【0016】しかしながら、食品公害上問題のある合成抗酸化剤に代って、その使用が期待されている天然の抗酸化剤は、化学合成法によるビタミンCおよび天然物から抽出精製されているビタミンEが実用化されているにすぎない。

【0017】また天然の抗酸化剤は、その起源が天候等自然条件に左右される植物や動物等であって安定供給が困難であり、また、その含有量も非常に微量であるため、抽出にも非常に困難が伴い且つ抽出中に成分が変化するという点から工業的に大量に抽出、製造することは困難であった。

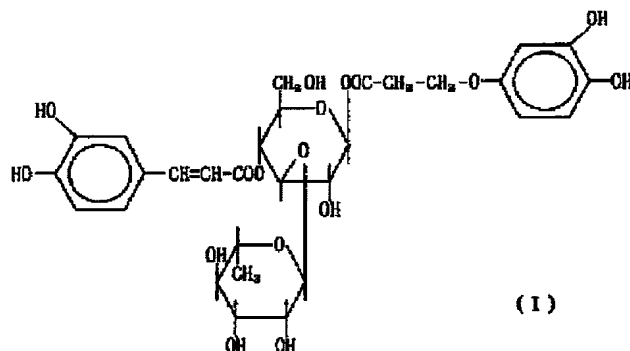
【0018】さらに香辛料等を起源とする抗酸化性物質の中には強い香や色を持つものが多く、こうした性質は食品、医薬品、化粧品などの使用を制限するものとなっている。

【0019】

【課題を解決するための手段】本発明はこれらの欠点を一挙に解決するためになされたものであって、各方面から鋭意研究の結果、ごま (*Sesamum indicum* L.) の植物成体から誘導した増殖性細胞 (カルス) を合成培地を用いて培養し、得られた培養細胞から、下記する化2で示される構造式 (I) を有する新規抗酸化性配糖体を大量に且つ計画的に工業生産することに成功し、本発明の完成に至ったものである。

【0020】

【化2】



【0021】ごま培養細胞から生成される本発明に係る新規抗酸化性配糖体は、カフェ酸をアグリコンとし六単糖をほぼ中心に配糖化した構造をとっており、水溶性と

脂溶性の中間的な極性を有する化合物であり、極端な極性を有するビタミンCやビタミンEとは異り、その応用範囲を広げるには非常に有利な物性を有している。した

5

がって、老化防止、発癌抑制などのさまざまな生理作用が期待される抗酸化性物質の応用として、食品、医薬品、化粧品などへも有効に利用される。

【0022】また本発明は、このような生産効率が非常に低い天然物からの有効成分の抽出という技術に鑑み、目的物質を効率的、且つ計画的、安定的に大量生産する方法を確立するためになされたものであって、生産効率が低く、自然条件の影響を直接受ける植物体からの抽出法を改善するために各方面から研究、検討した結果、バイオテクノロジーに着目し、細胞を人工培養する方法が最適であるとの結論に達した。

【0023】そこで、植物細胞の人工培養について徹底的に研究を行い、このように有用な成分を含むごまの増殖性細胞を育種するために、植物成体から人工的に増殖性細胞塊（カルス）を誘導し、これより安定的にかつ迅速に増殖する細胞を選択する研究を行ってきた。その結果、ごまの種子から無菌的に発芽させたごま芽ばえを素材として、ごま細胞のカルスを誘導し、安定に継代培養が可能で高温培養細胞を取得することに成功しただけでなく、増殖した細胞内に有用成分が含有されておりし

【0024】すなわち、本発明は、ごま培養細胞を、特に植物細胞培養では他に報告例のない高温（33～36℃）細胞培養法という全く新規な方法を確立することに成功したものであって、それにより新規なごま抗酸化性配糖体を大量に且つ計画的に生産する工業的方法を提供することができるのである。

【0025】本発明者らは、こうした工業的な植物細胞培養に適したごま培養細胞を育種する研究を鋭意おこなった結果、従来、植物細胞培養の可能な温度とは考えられていなかったごとき高温において、増殖性の高い細

6

胞を取得することに成功し、得られた培養細胞中には新規な抗酸化性配糖体が生成されていることを見出し本発明を完成したのである。

【0026】本発明の高温で旺盛に増殖する培養細胞の育種及び培養細胞より生成される新規抗酸化性配糖体の抽出、精製及び構造決定について以下に述べる。

【0027】先ず、ごまとしては、芽、根、又は種子を用いる。そして、無菌条件下で芽ばえを調製し、芽、茎、葉及び／又は根の切片を固体及び／又は液体の培地で培養してカルス細胞を誘導する。得られた増殖性カルスは、継代培養することにより大きなカルスを成長させる。次いでこれを固体及び／又は液体培養で、静置及び／又は攪拌培養してカルス細胞を増殖せしめるのである。

【0028】培地としては、各種培地を使用することができ、炭素源としては、グルコース、フラクトース等の単糖類、マルトース、シュクロース等の二糖類のほか、オリゴ糖や澱粉等の多糖類も使用することができる。窒素源としては、硝安、硝酸カリウムといった硝酸態窒素、硫酸、酒石酸アンモニウム等のアンモニア態窒素のほか、カザミノ酸、アミノ酸、ペプトン、コーンステープリカー、酵母菌体、イーストエキストラクト、麦芽エキストラクト等が使用できる。

【0029】そのほか、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、サイアミン、葉酸、ビオチン等のビタミン類；イノシトール、アデニル酸、グアニル酸、シチジル酸、チミジル酸、サイクリックAMP等の核酸関連物質；鉄、マンガン、亜鉛、ホウ素、ヨウ素、カリウム、コバルト、マグネシウム、モリブデン、リン、銅等のミネラルも使用する。

【0030】基本培地の1例を示すと、次の表1に示される第1表のとおりである。

【0031】

【表1】

第1表 基本培地

硝酸アンモニウム	1,650mg
硝酸カリウム	1,900
塩化カルシウム	440
硫酸マグネシウム	370
リン酸第1カリウム	170
ホウ酸	6.2
硫酸マンガン	22.3
硫酸亜鉛	8.6
ヨロソカリウム	0.83
モリブデン酸ナトリウム	0.25
塩化コバルト	0.025
硫酸銅	0.025
エチレンジアミン4酢酸ナトリウム	37.3
硫酸第1鉄	27.8
ミオイノシトール	100
グリシン	2
塩酸ピリドキシン	0.5
ニコチン酸	0.5
塩酸チアミン	0.1
蔗糖	30g
水	1,000ml

pH 5.7

【0032】基本培地にはオーキシン、サイトカイニン  
を添加するのが好ましく、オーキシンとしては、インド  
ール酢酸、インドール酪酸、フンタレン酢酸、2,4ジ  
クロロフェノキシ酢酸などが適宜利用される。また、サ  
イトカイニンとしては、ベンジルアデニン、カイネチン  
などが使用できる。これらの植物ホルモンやサイトカイ  
ニンは単独でも使用できるが、組合せて用いることが効  
果的である。増殖性のカルスの培養には、先の第1表に  
示した組成の培地でもよいが、さらに増殖性を改善する  
ためには、ココナツミルク、カゼイン加水分解物、ジャ  
ガイモ抽出液、コーンスティブリーカー、イーストエキ  
ストラクト、麦芽抽出液などの天然有機栄養源を添加す  
ることが有効である。培養温度は28～37℃で培養操  
作できるが、好ましくは33～36℃である。培養液の  
pHは弱酸性(pH5.6～6.0)が増殖に有利である。

【0033】このようにして得られたごまのカルス細胞  
から高温で安定に増殖できる細胞を育成するには、ジ  
ェランガムまたは寒天による固体平板培地に細胞の小塊  
を移植し、これを後記の増殖条件で1～2週間培養を行  
なう。このときの培養温度は33～36℃に維持すること  
が好ましい。

【0034】さらに、多数の高密度培養細胞の培養系統  
の中より、増殖性の高い培養系統を選択し、その細胞集  
団から、更に細胞の小塊を多数取り出し、これらを新し  
い培地に移植することによって、更に多数の培養系統を  
作る。こうした細胞の培養系統の継代培養を5～10

回、33～36℃の高温で、くり返すことによって、  
高温で安定に増殖できる、ごま培養細胞を育成する。

【0035】培養して得た増殖性細胞から抗酸化性物質  
を抽出するには、セルラーゼやリゾチームを用いる生物  
学的処理、化学的処理、機械的ないし超音波などの処  
理、又はこれを組合わせたりして細胞を破壊し、メタノ  
ール、エタノール、アセトン、クロロホルムその他の有  
機溶媒、水などの単独ないしは、これらの有機溶媒と水  
との混合液で抽出して回収できる。

【0036】抗酸化性物質の活性の分析は、リノール酸  
を反応基質とする空気による自動酸化量をロダン鉄法に  
よって測定する方法を用いる。この方法は、脂質の過酸  
化を調べるのに用いられる常法である。(アグリカルチ  
ュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Ag  
ricultural and Biological  
Chemistry) 第45巻、735頁(1981  
年))

【0037】次に本発明により育種され、高温培養が  
できる、ごま培養細胞の取得について実験工程を追って  
詳細に説明する。

【0038】

【1. 無菌的に生育したごま芽ばえの調製】ごま種子  
を、よく水洗したのち、75%エタノール水溶液に数秒  
間浸漬する。これを別に用意した殺菌水で洗浄し、つい  
で0.1%ベンザルコニウムクロライド(市販殺菌剤)  
液に2～5分間浸漬して種子に付着している微生物を殺  
菌する。この種子を再び殺菌水でよく洗浄したのち、1

%次亜塩素酸ナトリウム（和光純薬製）（0.1%の界面活性剤ツイーン20を含む）の殺菌剤液によって、30分間処理して、ごま種子を完全に殺菌する。

【0039】 いっぽう、殺菌した、ふた付きの広口容器（プラスチック製市販品）を用意する。これに前記第1表に示した組成の基本培地（ただし蔗糖は添加せず、固化剤として寒天の場合0.8~1.5%、ジュランガムの場合0.2~0.3%を添加した）を別途オートクレーブ殺菌したものを、広口容器に注いで固化させ播種用の固型培地とする。また、殺菌水と殺菌したガーゼを、広口容器に無菌的に入れて、播種用の床としてもよい。このような播種用の培地又は床に、殺菌処理したごま種子を無菌操作によって播種する。28~30℃の恒温室内で蛍光灯の光のもとで保温すると、殺菌処理したごま種子は死滅することなしに、発芽し、10日間程度で長さ3~5cmのごま芽ばえが調製できる。このごま芽ばえは、完全に無菌状態であり、増殖性細胞の育種に利用される。

【0040】

【2. ごま由来の増殖性細胞塊の誘導培養】前記第1表に示した組成の基本培地に、オーキシニンとして、ナフタレン酢酸（ $10^{-8}$ ~ $10^{-5}$  M）、あるいは、2,4ジクロロフエノキシ酢酸（ $10^{-8}$ ~ $10^{-5}$  M）、サイトカイニンとして、ベンジルアデニン（ $10^{-8}$ ~ $10^{-4}$  M）、あるいはカイネチン（ $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$  M）を組合せて添加した、各種組成の培地を調合する。これに、固化剤としてジュランガム0.2%または寒天0.8%を加えて、pHを5.7に調整したのち、微生物培養に常用されるベトリディッシュに分注して固化する。これに、先に述べたように無菌的に調製したごまの芽ばえの断片を移植し、温度28~30℃の恒温室内又は恒温箱の中で、暗所で培養を行なうと、培養2~3週間後には、ごま芽ばえの切断片の切り口より、細胞が増殖し、塊となってカルスを形成する。この増殖性のカルスを、同一組成の培地に継代培養することによって、大きなカルスを育てることができる。

【0041】 カルスの人工的な誘導に用いる基本培地は第1表に示した培地組成（ムラシゲースクールの培地）を用いたが、植物の細胞培養に通常用いられている培地ならいずれも使用できる。こうした培地の基本組成は、当業界においてよく知られている（植物細胞培養マニュアル、講談社（1984））

【0042】

【3. カルス細胞の増殖培養細胞の育成】ごまの芽ばえより誘導した増殖性細胞塊（カルス）は、第1表に示した組成の培地、ナフタレン酢酸（ $1\sim5\times10^{-5}$  M）、ベンジルアデニン（ $1\sim5\times10^{-5}$  M）、などのオーキシニンやサイトカイニンを添加したものに、更に固化剤としてジュランガム0.2%又は寒天0.8%を加えて滅菌、固化した培地を用いて、安定に増殖す

る細胞を育成する。

【0043】 ごま細胞は暗所でもよく増殖するが、明所の方が、更に増殖に活発である。したがって3,000~30,000ルクス、好ましくは8,000~15,000ルクスの明所においてよく増殖することが観察される。温度は、30~37℃でも増殖するが、好ましくは、33~36℃で培養することができる。

【0044】 ごまのカルスから高温で安定に増殖できる細胞を育成するには、ジュランガム又は寒天による固体平板培地に細胞の小塊を移植し、これを前記の増殖条件で1~2週間培養を行なう。

【0045】 このときの培養温度はカルス細胞の誘導培養に用いた温度よりも高温にする。すなわち培養温度を33~36℃に維持して、旺盛に増殖する細胞を濃縮することができる。

【0046】 このようにして得た多数の培養系統の中より、増殖性の旺盛な培養系統を選択し、その細胞集団から、更に細胞の小塊を多数取り出し、これらを新しい培地に移植することによって、再び多数の培養系統を調製する。こうした細胞の培養系統の継代培養を5~10回くり返すことによって、33~36℃の高温で安定に増殖できる。ごま細胞を育成する。

【0047】

【4. 増殖性細胞の培養】安定に継代培養が可能なごま細胞の増殖培養には、第1表に示した組成の培地が用いられるが、植物細胞の培養に通常よく用いられている組成の培地も利用できる。このような基本培地に、オーキシニンとして、ナフタレン酢酸（ $1\sim5\times10^{-5}$  M）、サイトカイニンとして、ベンジルアデニン（ $1\sim5\times10^{-5}$  M）を加えたものを調合する。液体培養の場合にはそのまま増殖培養に使用できるが、固体培地での培養の時には、これにジュランガム0.2%又は寒天0.8%を加えて、滅菌、固化させて使用する。細胞の増殖には光を照射するのが有利である。通常3,000~30,000ルクス、好ましくは8,000~15,000ルクスの照射であればよい。温度は28~37℃で増殖するが好ましくは33~36℃でよく増殖培養ができる。液体培養は、通常の微生物の培養に用いられる振とう培養法や通気攪拌培養法が適用できるが、微生物の培養に比較して、ゆるやかな条件で操作するのが好ましい。微生物の培養に比較して、酸素の必要量は著しく少なくてよいから、わずかに空気を通気しつつ、細胞が培養液の底に沈でんしない程度の攪拌を行うことが増殖に好ましい。

【0048】 増殖培養を更に効果的に行なうためには、培養液のpHを5.6~5.8に維持するのがよい。

【0049】 通常の増殖培養では、1~2週間で培養が終了するから、培養液から細胞を遠心分離法などの常法で回収することが可能である。また固体培養の場合には、増殖した細胞塊は容易に回収できる。

【0050】かくして、工業的な規模で、生産が可能ながま細胞の育成を行い、これを多量に増殖培養することが出来るのである。

【0051】このような操作によって取得された高温度培養が出来るごま培養細胞の増殖量と培養温度との関係を図4に示す。植物細胞を通常培養する時に用いられている25～28℃の温度における増殖量に比べて、35～36℃では、約2倍以上の増殖量を示しており増殖速度も早くなることから工業的な植物細胞の培養において、有効に使用できるものである。

【0052】

【5. 抗酸化性物質の抽出及び分析】上記によって得た増殖性のカルス細胞を、ブレンダー等で細かく破碎したのち、石英砂と共に磨砕する。これをメタノールなどの溶媒で抽出し、無水硫酸ナトリウムによって脱水し、30～35℃で蒸発乾固する。再びメタノールに溶解させて、抗酸化性物質を含んだ分画を得る。

【0053】次に抗酸化活性の分析法について述べる。リノール酸を反応基質とする方法であり、油脂の酸化の程度を測定するためによく用いられているロダン鉄法を利用するものである。即ち油脂の自動酸化により生成する過酸化物によって二価鉄イオンが三価鉄イオンに酸化され、これがチオシアン酸アンモニウムと反応し赤色のロダン鉄を生成させ、その吸光度を測定することから、油脂の過酸化物の量を求める方法である。(アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー)(Agricultural and Biological Chemistry, 第45巻、735頁(1981年))

【0054】また、ロダン鉄法に比較してより生体系に近い分析法として兎赤血球膜脂質の過酸化反応を利用した、いわゆる赤血球ゴースト法も併せて使用した。

【0055】兎の赤血球から、その膜のみを調製し、これを赤血球ゴーストと呼ぶ。

【0056】この赤血球ゴーストに、酸化の開始剤として、 $t$ -ブチルハイドロキシパーオキサイドを加えて、赤血球膜のリン脂質の過酸化反応を促進させたのち、生成するマロンジアルデヒドあるいは、これに類似した物質を、チオバルビツール酸で発色させ、その吸光度を測定するのである。(バイオケミストリー、78巻、6858頁(1981年))

【0057】反応系に添加されるサンプル中の抗酸化活性の程度によって、チオバルビツール酸による発色度が変化するから、抗酸化性物質を含まない対照区と比較することによって、サンプル中に含まれている抗酸化活性を測定することができる。

【0058】

【6. 新規抗酸化性配糖体の抽出、分離及び構造解析】液体培養法によって増殖した細胞は、重力分離法や遠心分離法によって容易に回収することができる。得られた

細胞を最終濃度が80%になるようにエチルアルコールを添加し、機械攪拌ホモジナイザーによって抽出する。遠心分離して抽出液を回収した残りの細胞について再び80%エチルアルコールで抽出する。得られた抽出液を減圧下で濃縮して乾固すればアメ状、黄褐色の抗酸化性物質の粗抽出物が得られる。

【0059】これを、たとえばアンバーライトXAD-Hを用いる吸着クロマトグラフ法によって、樹脂に吸着させ、水とメタノールの混合溶媒によって溶出し、抗酸化活性のある画分を取得する。メタノール60%水溶液により溶出する分画を集め、これを減圧濃縮することにより、ごま培養細胞中に含まれている抗酸化性物質の代表的な成分を得る。

【0060】天然物化学の技術分野で、通常用いられている高速クロマトグラフ法により、含有成分の分離分析を行うことによって、目的成分の精製程度を検定する。ごま培養細胞のアルコール抽出物の吸着クロマトグラフ法により60%メタノール水溶液で溶出したフラクションの高速液体クロマトグラフのチャート図を図5に示す。

【0061】多数のピークの中より、強い抗酸化活性をもつピークを更に精製する。この時、天然物の精製法として通常用いられている、高速液体クロマトグラフ法を、くり返し使用して、順次目的物質を純化する。図6に、高速液体クロマトグラフ法により精製した抗酸化性物質の単一性を示す。

【0062】単一な成分として単離された抗酸化性物質について機器分析を行い、その化学構造を以下のように決定した。

【0063】先ず、単離された抗酸化性物質の紫外線吸収スペクトラムを、図7に示す。得られた紫外線吸収スペクトラムは、いずれも、カフェ酸系化合物の特徴とよく符号していた。

【0064】次に高速電子衝突質量分析法(FAB-MS)により解析し、図8に示すようなマススペクトラムを得た。これより、分子イオンピーク(M-1)<sup>+</sup>は667であり、抗酸化性物質の分子量は668と判明した。またプロトン核磁気共鳴法(NMR)により、二置換 $\alpha$ -オレフィン、2つの芳香族環の存在と置換様式が解明された(図9)。

【0065】精製した抗酸化性物質は、糖の呈色反応により糖分子が結合した配糖体であることが判っていたが、その構造を決定するために炭素13核磁気共鳴法により構造の解析を行った。そのスペクトラムを図10に示す。

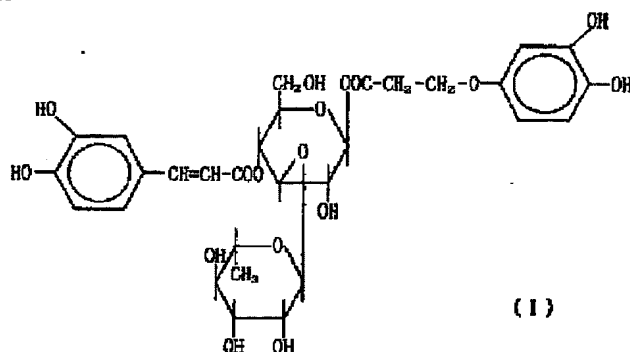
【0066】こうした天然物の構造解析法を駆使して、ごま培養細胞由来の抗酸化性物質の構造を下記の化3で示される構造式(I)と決定した。

【0067】

【化3】

13

14



【0068】

【7. 新規抗酸化性配糖体の抗酸化活性】ごま培養細胞から80%エタノールで抽出して得た粗抽出物、これをアンバーライトXAD-I Iによる吸着クロマトグラフ法により60%メタノール水溶液で溶出して得た中間精製物、さらに、中間精製物を高速液体クロマトグラフ法により単一ピークまで精製した抗酸化性配糖体は、前述の兎赤血球ゴースト法により、抗酸化活性を測定した結果を図11にそれぞれ示した。横軸は分析における反応系に添加したサンプルの濃度をとり、縦軸に、チオバルビツール酸による発色度を、抗酸化性物質を無添加の対照区を100%として相対比率で示した。市販されている合成抗酸化剤ブチルヒドロキシアニソール(BHA)を抗酸化剤の対照区に用いて比較したものである。

【0069】このように、ごの培養細胞から抽出して得た抗酸化性配糖体は、BHAにほぼ相当する抗酸化活性をもっていることがわかった。

【0070】抗酸化剤として工業的に抗酸化性配糖体を応用する時には、目的に応じて精製品や粗製品を使用することが便利である。

【0071】このことは図11に示したように、純品にまで精製した標品と、吸着クロマトグラフ法によって得られた中間精製品の抗酸化活性に大きな差はなく、厳密に考えると中間精製品に含まれている、単離した抗酸化性配糖体以外の成分にも抗酸化活性が認められたり、また、共存物質による抗酸化活性の促進作用(相乗作用)が考えられる。こうしたことは、粗製品でも使用できることを十分に示唆するものである。

【0072】したがって本発明に係る抗酸化剤は、構造式(I)で示される化合物を有効成分として含有するものがすべて包含されるものであり、ごま培養細胞から抽出して得られる精製品はもとより、それまでに至る各段階によって得られる半精製品、粗製品をすべて包含するものである。

【0073】本発明に係る化合物は、配糖体であるが、配糖体の構造をもっていることは、水溶性と脂溶性の双方の特性を示すことが特徴として考えられ、したがって本発明化合物は、水溶性のビタミンC、脂溶性のビタミンEやブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル

ヒドロキシトルエン(BHT)などに比較して、抗酸化剤としての使用範囲が拡大され、また生体内での作用においても、有利性が大いに期待される。

【0074】以下に実施例及び試験例をもって本発明を説明するが、これらは例示であって、本発明を制限するものではない。

【0075】なお、本発明に使用する各細胞は、通常のごま植物を用い、前記した手法及び後記する実施例の手法にしたがってごま成体細胞をそれぞれ処理すれば容易に取得することができ、十分に再現性があることが確認された。原料の入手にも何の困難性もなくその処理にも格別の困難は無いので、本発明に使用する細胞は、何人も容易に入手することができるのである。

【0076】

【実施例1】(1)ごま(*Sesamum indicum* L.)の種子を用意し、これを75%エタノール液に数秒間浸漬したのち、殺菌した蒸留水で2回水洗した。これを0.1%ベンザルコニウムクロライド塩(甘槽化学産業(株)製)に2分間浸漬した。殺菌した蒸留水で3回よく洗浄したのち、1%次亜塩素酸ナトリウム(和光純薬)、0.1%ツイーン20(和光純薬)を含む殺菌剤液に30分間浸漬し、殺菌水で水洗して殺菌ごま種子を調製した。

【0077】植物培養用のプラスチック製容器(フロー・ラボラトリー社製)に殺菌水と殺菌したガーゼを入れ、その上に、予め殺菌したごま種子を播種した。30℃の恒温室で20ワットの蛍光灯の光のもとで2週間放置したところ、長さ5~7cmのごま芽ばえが得られた。

【0078】(2)第1表に示した組成の培地21を調製し、これを等分し、それぞれの100mlに、ジュランガム(三栄化学工業製)0.2%と、表2に示した実験条件のサイトカニン、オーキシンを添加して、増殖性細胞塊(カルス)の誘導培地とした。これらを常法にしたがい120℃、10分間のオートクレープ殺菌処理をした。

【0079】これらの培地を、温かいうちに、直径10cmのプラスチック製ベトリディッシュにそれぞれ3枚宛30mlづつ分注し、室温で固化させた。



15

16

【0080】これに(1)で調製した、ごま芽ばえを無菌操作によって、茎、葉を5~7mmの切片に切断して、ペトリディッシュの固型培地上に移植した。水分の蒸発を防止するためパラフィルム(アメリカン・カン社製)で封をし、28~30℃の恒温室に暗所で3週間放\*

\*置してごま芽ばえ切片からのカルスの誘導を行ない、表2で示される第2表の結果を得た。

【0081】

【表2】

第2表

サイトカイニン	オーキシン	カルスの誘導状態
ベンジルアデニン $1 \times 10^{-5} M$	ナフタレン酢酸	
	$5 \times 10^{-5} M$	++++
	1	+++
	0.1	++
	0.01	-
	2,4ジクロロフェノキシ酢酸	
	$5 \times 10^{-5} M$	-
	1	+
	0.1	++
	0.01	++++
カイネチン $1 \times 10^{-5} M$	ナフタレン酢酸	
	$5 \times 10^{-5} M$	++++
	1	++++
	0.1	+++
	0.01	-
	2,4ジクロロフェノキシ酢酸	
	$5 \times 10^{-5} M$	+
	1	+
	0.1	+++
	0.05	++++

+: カルス誘導の量を示す。+印が多いほど良好である。

-: カルス誘導なし。

【0082】(3)第1表の組成の基本培地に、ジュランガム0.2%、ナフタレン酢酸 $5 \times 10^{-5} M$ 、ベンジルアデニン $1 \times 10^{-5} M$ を添加した培地600mlを、(1)と同様にして殺菌調製した。これをプラスチック製ペトリディッシュ20枚にそれぞれ30ml宛分注して固化させた。(1)で誘導培養して得た増殖性カルスを、ペトリディッシュ当り4ヶ宛移植した。33~36℃、12,000ルクスの光の植物細胞培養装置の中で、2週間培養を行った。増殖性の良好な細胞集塊を選抜し、これを種細胞として、33~36℃で継代培養を4回くり返した。かくして、高温で安定に増殖する培養細胞を育成した。この細胞をN<sub>5</sub>B<sub>5</sub>S-HT(ナフタレン酢酸 $5 \times 10^{-5} M$ 、ベンジルアデニン $1 \times 10^{-5} M$ で継代培養したごま培養細胞)と命名した。

【0083】(4)第1表の組成の基本培地にジュランガム0.2%、ナフタレン酢酸 $5 \times 10^{-5} M$ 、ベンジ

ルアデニン $1 \times 10^{-5} M$ を添加した培地1lを、(1)と同様にして殺菌調製した。これを直径4cm、深さ13cmの植物細胞培養用のガラス製容器に40ml宛分注して固化させた。(3)で継代培養して育成したごまの増殖性細胞N<sub>5</sub>B<sub>5</sub>S-HT細胞の5~7mm角を移植して35~36℃、12,000ルクスの光の植物細胞培養装置の中で10日間培養を行った。その結果、培養容器中に増殖した細胞の生重量は平均14.5gであった。

【0084】この細胞のうち60gを乳ばちに取り、6gの石英砂を加えて5分間磨砕したのち80%エタノール水溶液200mlを加えてよく攪拌し抗酸化性物質を抽出した。これを遠心分離(2,500回転/分、10分間)して上澄液を集め、細胞残渣には再び200mlの80%エタノール水溶液を加えて抽出した。3回のエタノール水溶液による抽出液を集め40℃でロータリエ

バポレーターにて蒸発乾固し、黄褐色の抽出物4.8gを取得した。

【0085】

【実施例2】第1表に示した組成の培地31を、通気攪拌装置を備えた51容量の植物細胞培養槽に入れ、オートクレーブによって、120℃、2分間加圧殺菌した。別の300ml三角フラスコに第1表に示した組成の培地60mlを入れ、同様に殺菌したものに、ごま培養細胞のシードを添加し、35℃、蛍光灯の光照射下で、振とう数60往復/分の条件で振とう培養した。7日間培養したフラスコ5本分の培養細胞を無菌操作によって回収し、植物細胞培養槽に接種した。植物細胞培養槽の培養条件は、攪拌数30回転/分、pH5.7±0.1、通気量1.5l/分、光照射8,000ルクス、温度35℃で10日間培養した。培養終了液を遠心分離して、細胞を回収したところ、乾燥重量として39gが取得された。

【0086】培養して得られたごま細胞を生重量として500gを用いて抗酸化性物質の抽出精製を行った。すなわち1.9lのエタノールを加えて、ホモジナイザーにより攪拌しつつ20分間抽出したのち、濾過器によって細胞と抽出液を分離した。細胞残渣に2lの80%エタノール水を加え、同様に抽出操作を20分間行ったのち濾過器によって細胞残渣を分離し、更に2lの80%エタノールで抽出した。

【0087】抽出液を合せて、40℃で減圧濃縮を行い褐色の粗抽出物12.8gが取得された。

【0088】吸着クロマトグラフ法を用いるアンバーライトXAD-II樹脂を直径5cm、長さ40cmのガラス製カラムに充填して、水を流して平衡化した。これに抽出物5gをカラムの上部に樹脂に吸着させた状態で重層し、水から順次メタノール濃度を増加させる段階溶出法によって、目的物質の溶出を行った。60%メタノールで溶出される分画を集め、40℃で減圧濃縮したところ、黄褐色の中間精製物の184mgが得られた。これを高速液体クロマトグラフ法を繰返して、単一ピークになるまで精製を行った結果、精製物として抗酸化性配糖体が18mg得られ、その化学構造を構造式(I)で示されるものであることを確認した。

【0089】実施例で得られた、この粗成分、中間精製物、および精製物について、それらの抗酸化活性を兎赤血球ゴースト法により測定したところ、図11に示すように、プチルヒドロキシアニソール(BHA)とほぼ同程度の強い抗酸化活性が認められた。

【0090】

【試験例1】本発明によって調製した抗酸化性配糖体のすぐれた抗酸化効果を次のようにして確認した。

【0091】実施例によって得た抽出物100mgを100mlの80%エタノール水溶液に溶かし(1mg/1ml濃度)、抗酸化性物質の分析サンプルとした。こ

れの1mlをサンプルとしてリノール酸の自動酸化の抑制の程度をロダン鉄法によって測定した。その結果、図12からも明らかなように、ごま増殖細胞から抽出した画分(1mg)には、 $\alpha$ -トコフェロール(0.2mg)あるいは、プチルヒドロキシアニソール(BHA、0.2mg)に相当する高い活性の抗酸化性物質が含まれていることが確認された。

【0092】

【発明の効果】本発明は、高温増殖性ごま細胞を培養容器の中で多量に調製し、それによって、ごま細胞中に含まれている新規抗酸化性配糖体を工業的に大量に生産することを可能としたものである。したがって本発明の方法によれば、栽培によらず工業的な手段によって、安全な食品、医薬品、化粧品として使用される天然物由来の新規抗酸化性配糖体を計画的に且つ大量に供給することができるという著効が奏されるのである。

【0093】また本発明によって新規抗酸化性配糖体の化学構造が解明されたので、これを化学的に修飾、変形することにより更に新規化合物の創製、新規抗酸化性物質の開発が可能となる。そして更に、化学合成法による本化合物の製造法の確立も期待され、抽出法よりも更に工業的に本化合物を大量生産することも可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】多価不飽和脂肪酸(PUFA)の自動酸化機構を図示したものである。

【図2】フェノール性抗酸化性物質の構造を図示したものである。

【図3】ごまから単離された抗酸化性物質の構造を図示したものである。

【図4】高温培養細胞の増殖量と培養温度との関係を示すグラフである。

【図5】吸着クロマトグラフ法で溶出した中間精製品の液体クロマトグラフ法による含有成分の組成を示す図面である。

【図6】液体クロマトグラフ法により精製した抗酸化性物質のクロマトグラムである。

【図7】精製した抗酸化性物質の紫外線吸収スペクトラムである。

【図8】精製した抗酸化性物質の高速電子衝突マスペクトルによる解析図である。

【図9】精製した抗酸化性物質のプロトン核磁気共鳴法によるスペクトラムである。

【図10】精製した抗酸化性物質の炭素13核磁気共鳴法によるスペクトラムである。

【図11】兎赤血球ゴースト法によるごま培養細胞からの粗抽出物、中間精製品、精製品の抗酸化活性を示したものである。

▲：粗抽出物

●：中間精製品

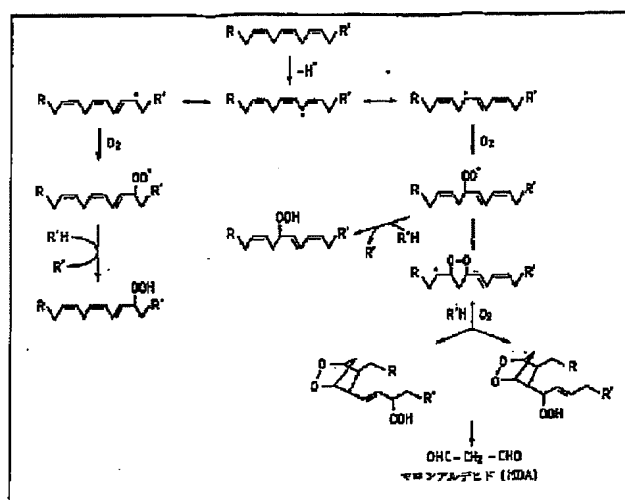
◆：精製品

19

○: プチル・ヒドロキシ・アニソール (BHA)

【図12】 リノール酸を反応基質とした自動酸化の経過をロダン鉄法により分析した、リノール酸の酸化曲線である。

【図1】



20

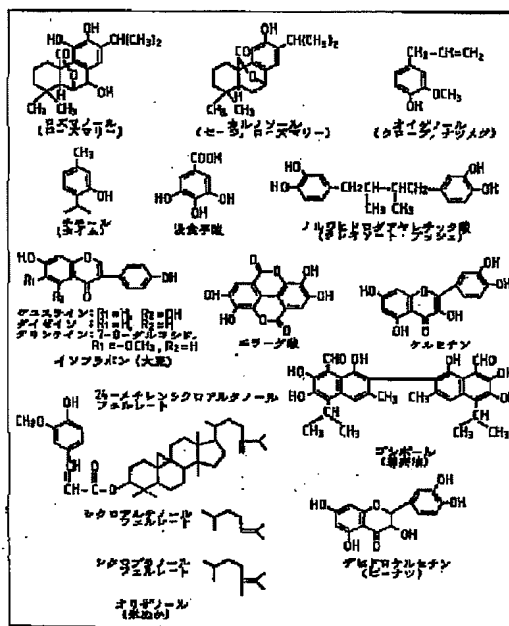
—●—: 対照区

—○—: α-トコフェロール区

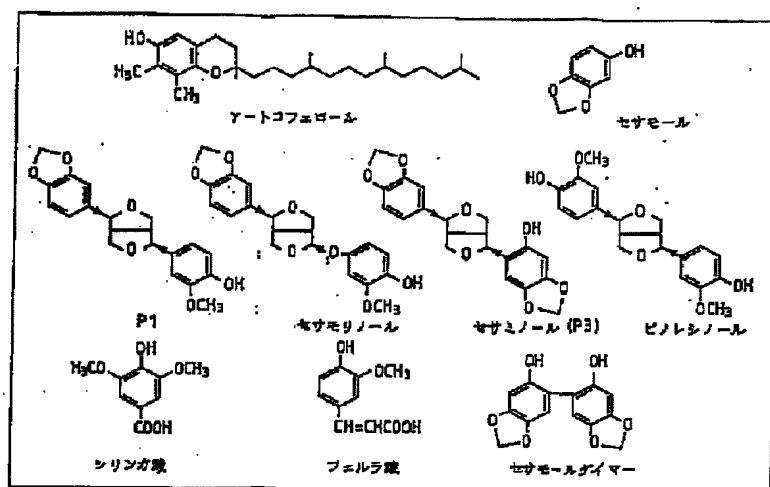
—△—: プチルヒドロキシアニソール区

—◎—: ごま細胞よりの粗抽出物

【図2】

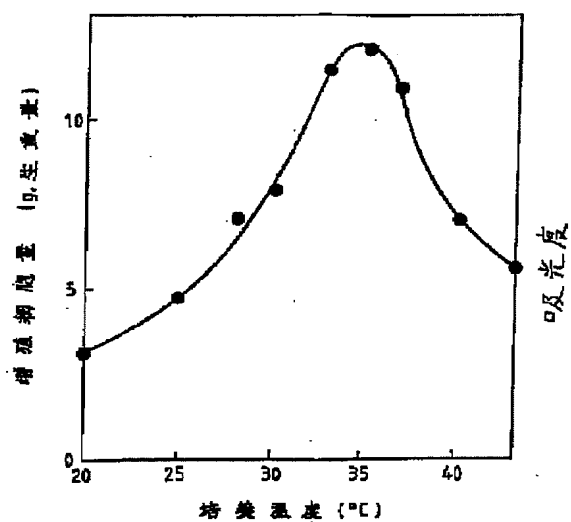


【図3】



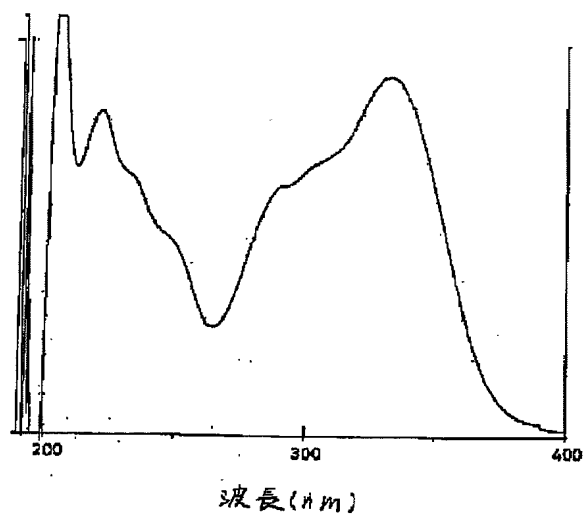
【図4】

第 4 図



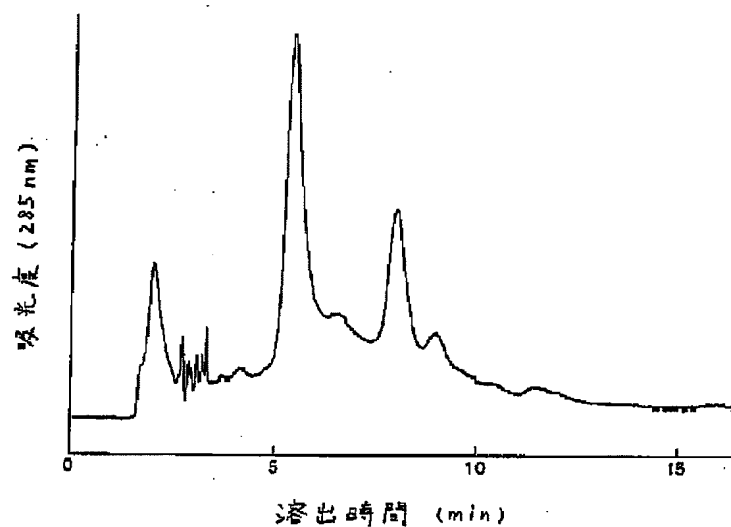
【図7】

第 7 図



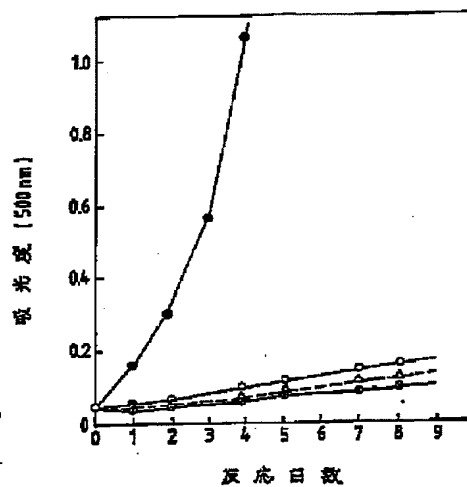
【図5】

第 5 図



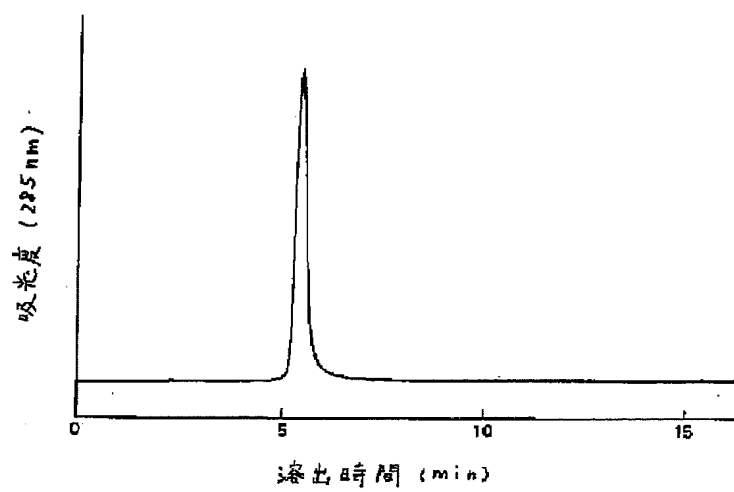
【図12】

第 12 図



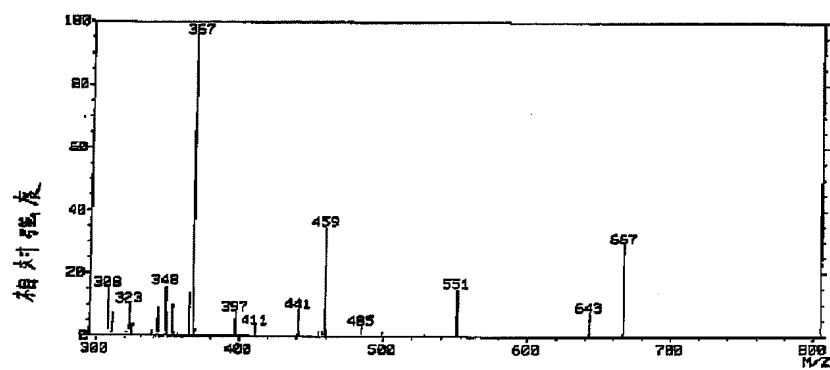
【図6】

第6図



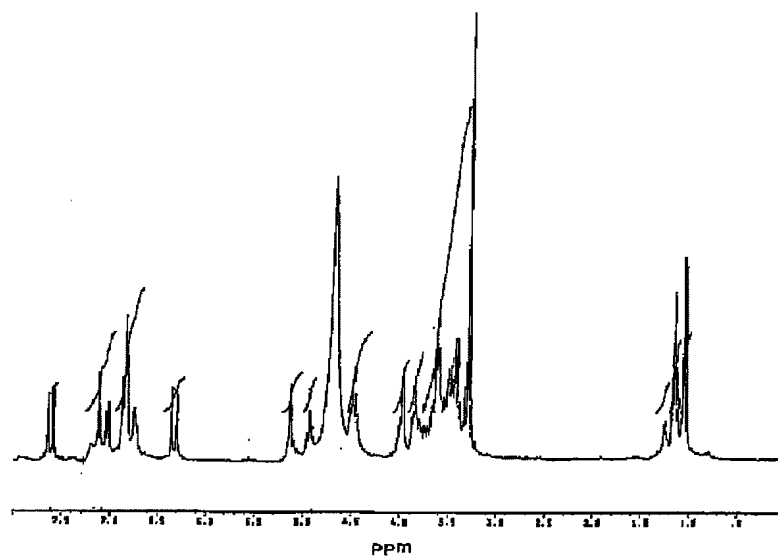
【図8】

第8図



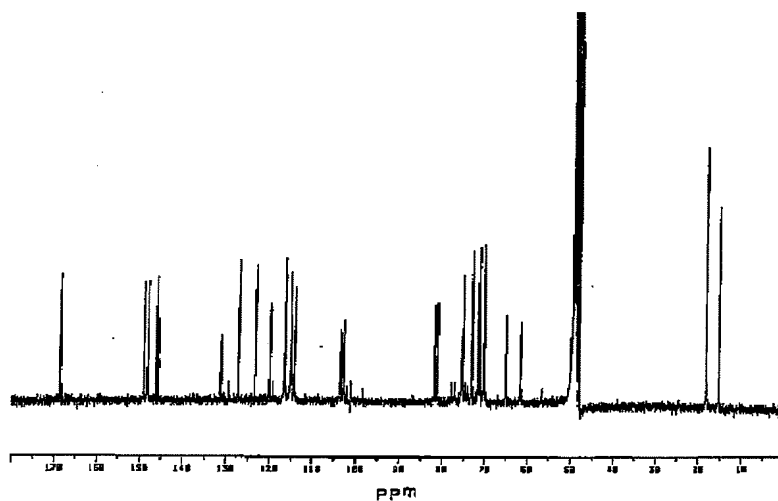
【図9】

第9図



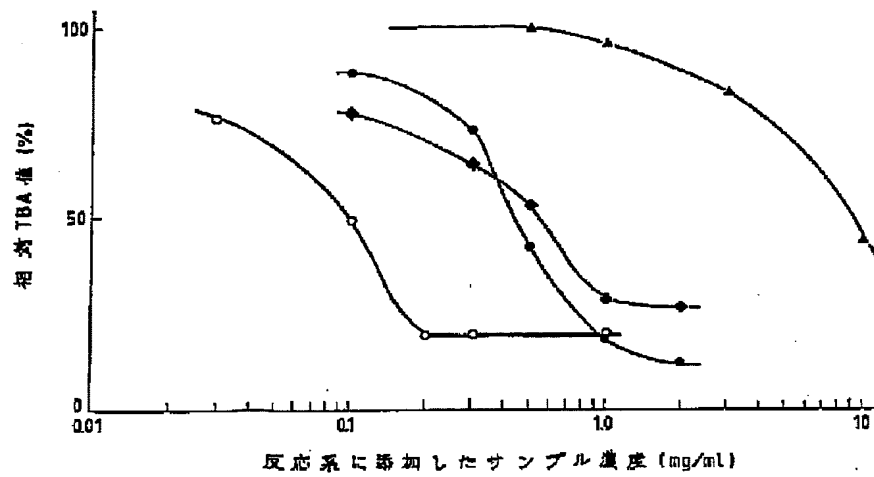
【図10】

第10図



【図11】

図 11 図



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

// A 61 K 7/00

47/26

C 12 N 5/04

(C 12 P 19/12

C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

F 7327-4C

K 7329-4C

【公報種別】公開特許公報の訂正

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成6年(1994)11月8日

【公開番号】特開平4-273888

【公開日】平成4年(1992)9月30日

【年通号数】公開特許公報4-2739

【出願番号】特願平3-115714

【訂正要旨】要約書、明細書誤載につき下記の通り全文を訂正する。

【国際特許分類第5版】

C07H 13/04                7822-4C

A23L 3/343               2114-4B

C09K 15/08               7188-4H

C12P 19/12               7432-4B

// A61K 7/00              F 7252-4C

47/26                      K 7433-4C

C12N 5/04

(C12P 19/12

C12R 1:91 )

【F I】

C12N 5/00                F 9281-4B

【記】別紙のとおり



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-273888

(43)公開日 平成6年(1994)11月8日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 13/04		7822-4C		
A 2 3 L 3/3436		2114-4B		
C 0 9 K 15/08		6917-4H		
C 1 2 P 19/12		8214-4B		
		7236-4B		
			C 1 2 N 5/ 00	F
			審査請求 未請求 請求項の数 4 (全 18 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-115714

(22)出願日 平成3年(1991)2月27日

(71)出願人 000001199

株式会社神戸製鋼所

兵庫県神戸市中央区脇浜町1丁目3番18号

(72)発明者 三村 精男

静岡県富士市宮下435-7

(72)発明者 竹林 恵一

茨城県つくば市春日 2-18-5

(72)発明者 高原 義昌

千葉県習志野市谷津5-29-8

(72)発明者 大澤 俊彦

愛知県春日井市押沢台7丁目9-8

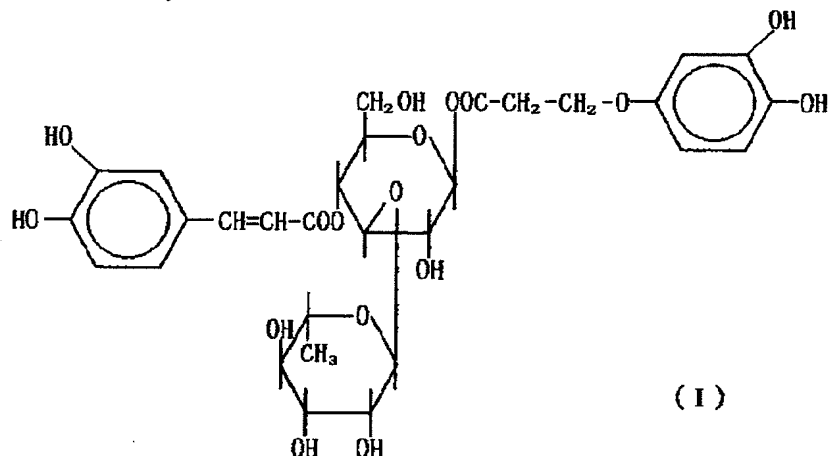
(74)代理人 弁理士 戸田 親男

(54)【発明の名称】 新規抗酸化性配糖体、その製法及び用途

(57)【要約】 (修正有)

【構成】ごま(*Sesamum indicum* L.)の植物成体から細胞\*

\*を培養し、その培養培地から分取した、式(I)を有する配糖体。



【効果】 すぐれた抗酸化作用を示し、食品、医薬品、化粧品などに応用できる。

1

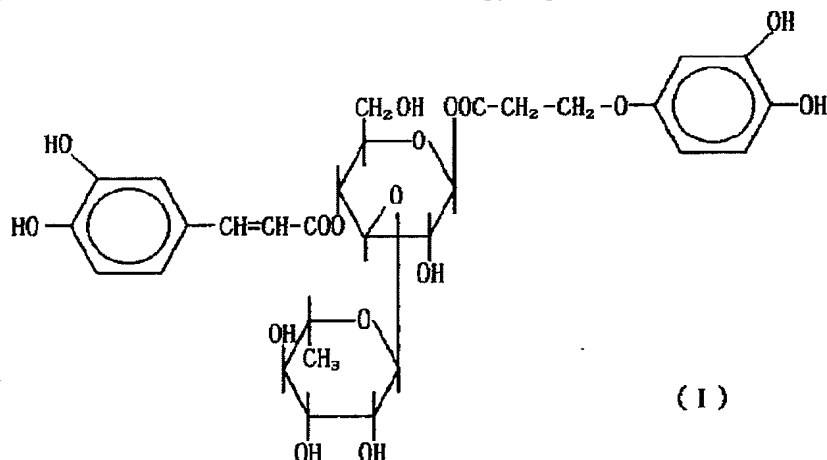
2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の

\* 【化1】で示される構造式(1)を有する配糖体。

\* 【化1】



(I)

【請求項2】 ごま (*Sesamum indicum* L.) の植物成体から誘導した増殖性細胞を培地に培養し、その培養物から、構造式(1)を有する配糖体を製造する方法。

【請求項3】 ごま (*Sesamum indicum* L.) の植物成体から誘導した高温培養細胞を培地に培養し、その培養物から構造式(1)を有する配糖体を製造する方法。

【請求項4】 構造式(1)で示される配糖体を有効成分とする抗酸化剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、植物由来の有用物質に関するものであり、更に詳細には、ごま (*Sesamum indicum* L.) の植物体より人工的に誘導した細胞(カルス)の大量培養法によって、配糖体化合物を工業的に大量に製造する技術に関するものである。

【0002】本発明に係る配糖体は、従来未知の天然物起源の新規化合物でありしかも強力な抗酸化活性を有するので、本発明は食品産業のほか、医薬品産業及び化粧品産業等に広く応用されるものである。

【0003】また、本発明に係る配糖体は、その化学構造が明らかとなっているので、これを化学修飾したり変形したりすることにより新規誘導体の開発が可能となり、新規な抗酸化性物質の出現も大いに期待することができる。そのうえ、化学合成による該配糖体の製造法の開発も期待することが可能となるので、該配糖体を更に工業的に大量に生産することも可能となり、これらの面での本発明の利用性も顕著なものがある。

【0004】

【従来の技術】我々人間を初め地球上の多くの生物にとって、酸素は不可欠である。しかし、最近、生体内における過剰量の酸素はラジカルや過酸化脂質を生成し、その結果各種組織が障害を受けることが問題となってい

る。この障害は動脈硬化、肝疾患、網膜症、炎症などの病因となることが明らかになっており、さらに老化や発癌との関連も示されている。

20 【0005】脂質が過酸化される例として、生体の重要な構成成分であると共に、必須脂肪酸として不可欠な食品成分である多価不飽和脂肪酸(PUFA)は、図1で示される第1図に示すような自動酸化と呼ばれるラジカル連鎖反応を引き起こし、過酸化脂質やマロンジアルデヒド(MDA)が初めとする酸化分解物を生成することが知られている(大澤・並木「現代の食品化学」三共出版p.186)。

【0006】一方、このような脂質の酸化的劣化を防止するために、食品系では冷凍保蔵や包装、脱酸素剤の使用などの物理的手段と共に、抗酸化剤の添加という化学的手段と共に、抗酸化剤の添加という化学的手段が一般的である。特にBHA(ブチルヒドロキシアニソール)やBHT(ブチルヒドロキシトルエン)を初めとする合成抗酸化剤が長く使用されてきたが、最近に至って安全性の面から食品への使用が再検討されつつある。

【0007】そこで、その需要が急増してきたのは天然ビタミンEであるが、価格や効果の点から更に有効で安全な天然抗酸化性物質の開発が要望されているのが現状である。さらに、天然抗酸化性物質の積極的な摂取により生体内のラジカル生成や脂質過酸化反応を抑制し、その結果、老化や発癌を初めとするさまざまな疾患を防止し得ると考えられている(大澤「食品の健全性と食品成分の生理機構」缶詰技術研究会p2)。

【0008】こうした天然由来の抗酸化性物質や食品や医薬品、化粧品などに適宜使用するためには、従来とは性質の異なった天然抗酸化性物質を見出し、それぞれの特徴を発揮する条件で活用することが重要である。

【0009】天然系物質の内、例えば植物由来の香辛料等には、抗酸化活性をもった種々の化合物が含まれており(図2)、香辛料は食品保存作用を持つものとしても

食品に添加されてきた。しかしながら香辛料には、強い香や色を示すものが多く、こうした性質はこれらを食品、医薬品、化粧品などに応用する場合に使用範囲を大幅に限定してしまう。

【0010】実用例の代表としては、化学合成法によるビタミンCおよび天然物から抽出精製されているビタミンEが挙げられている。この内、ビタミンCは水溶性の物質であるため、油や生体内の脂質には溶けない。一方、ビタミンEは脂溶性であるため、血液などの水溶液には溶けず生体内の脂質に蓄積される特徴が認められている。こうした極端な水溶性や脂溶性の性質は、生体に

応用する食品、医薬品、化粧品などの場合、必ずしも有利な性質とは考えられておらず、生体内の脂質と水溶液のいずれにおいても適宜、抗酸化活性を発揮するためには、水溶性と脂溶性の両方の性質をもつ天然化合物が有利である。

【0011】本発明は、このような天然植物の内、特にごまに着目し、黒ごま (*Sesamum indicum* L.) の植物成体より誘導して得られた増殖性細胞を培養し、その培養物から構造式 (I) で示される配糖体化合物を得、これらの化合物に強力な抗酸化活性を認めたものであるが、構造式 (I) で示される化合物は、図3で示されるごまの種子から単離された代表的なリグナン系化合物とは全く異なり、新規化合物である。

【0012】さらに、ごま培養細胞より生成される本発明に係る新規抗酸化配糖体は、カフェ酸をアグリコンとし、六単糖をほぼ中心に配糖化した構造をとっていることにより水溶性と脂溶性の中間的な極性を示すものである。こうした性質は、さまざまな生理作用が期待される抗酸化性物質の食品、医薬品、化粧品などへの応用に非常に有利であり、他の抗酸化性物質には全く見当らない。

【0013】また、本発明は、植物体自体から抽出するものではなく、抗酸化性配糖体を生産する培養細胞を用いるものであって、ごま細胞を大量培養することにより天然の抗酸化性配糖体を工業的に大量生産することに成功したものであって、この点においても新規である。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】化学工業の発展を背景として、合成抗酸化剤、例えばブチルヒドロキシアニソール (BHA) やブチルヒドロキシトルエン (BHT) などが一般的に使用されてきた。ところが、こうした合成抗酸化剤の使用が増えるにつれて、食品公害が増加して安全性の面から大きな問題が生じ、消費者の合成抗酸化剤に対する拒否反応が強くなり、その使用量も低下しているのが現状である。

【0015】したがって安全性の高い、天然由来の抗酸化性物質は、生体内における抗酸化的な生体の防御機構を支援する物質として、食品、特に機能性食品、健康食品や栄養食品のほか、医薬品や化粧品の技術分野において非常に期待されている。

【0016】しかしながら、食品公害上問題のある合成抗酸化剤に代って、その使用が期待されている天然の抗酸化剤は、化学合成法によるビタミンCおよび天然物から抽出精製されているビタミンEが実用化されているにすぎない。

【0017】また天然の抗酸化剤は、その起源が天候等自然条件に左右される植物や動物等であって安定供給が困難であり、また、その含有量も非常に微量であるため、抽出にも非常に困難が伴い且つ抽出中に成分が変化するといった点から工業的に大量に抽出、製造することは困難であった。

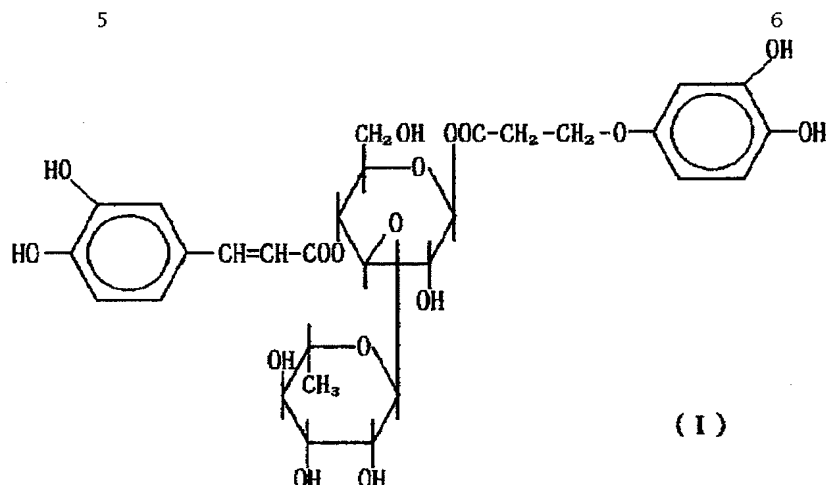
【0018】さらに香辛料等を起源とする抗酸化性物質の中には強い香や色を持つものが多く、こうした性質は食品、医薬品、化粧品などの使用を制限するものとなっている。

【0019】

【課題を解決するための手段】本発明はこれらの欠点を一挙に解決するためになされたものであって、各方面から鋭意研究の結果、ごま (*Sesamum indicum* L.) の植物成体から誘導した増殖性細胞 (カルス) を合成培地を用いて培養し、得られた培養細胞から、下記する化2で示される構造式 (I) を有する新規抗酸化性配糖体を大量に且つ計画的に工業生産することに成功し、本発明の完成に至ったものである。

【0020】

【化2】



【0021】ごま培養細胞から生成される本発明に係る新規抗酸化性配糖体は、カフェ酸をアグリコンとし六単糖をほぼ中心に配糖化した構造をとっており、水溶性と脂溶性の中間的な極性を有する化合物であり、極端な極性を有するビタミンCやビタミンEとは異り、その応用範囲を広げるには非常に有利な物性を有している。したがって、老化防止、発癌抑制などのさまざまな生理作用が期待される抗酸化性物質の応用として、食品、医薬品、化粧品などへも有効に利用される。

【0022】また本発明は、このような生産効率が非常に低い天然物からの有効成分の抽出という技術に鑑み、目的物質を効率的、且つ計画的、安定的に大量生産する方法を確立するためになされたものであって、生産効率が低く、自然条件の影響を直接受ける植物体からの抽出法を改善するために各方面から研究、検討した結果、バイオテクノロジーに着目し、細胞を人工培養する方法が最適であるとの結論に達した。

【0023】そこで、植物細胞の人工培養について徹底的に研究を行い、このように有用な成分を含むごまの増殖性細胞を育種するために、植物成体から人工的に増殖性細胞塊（カルス）を誘導し、これより安定的にかつ迅速に増殖する細胞を選択する研究を行ってきた。その結果、ごまの種子から無菌的に発芽させたごま芽ばえを素材として、ごま細胞のカルスを誘導し、安定に継代培養が可能な高温培養細胞を取得することに成功しただけでなく、増殖した細胞内に有用成分が含有されておりしかもそれを有利に抽出できることをはじめて見出し、これらの新知見を基礎にして更に研究の結果、有用成分の精製及び構造決定にも成功し、ここに本発明が完成されたのである。

【0024】すなわち、本発明は、ごま培養細胞を、特に植物細胞培養では他に報告例のない高温（33～36℃）細胞培養法という全く新規な方法を確立することに成功したものであって、それにより新規なごま抗酸化性配糖体を大量に且つ計画的に生産する工業的方法を提供することができるのである。

【0025】本発明者らは、こうした工業的な植物細胞培養に適したごま培養細胞を育種する研究を鋭意おこなった結果、従来、植物細胞培養の可能な温度とは考えられていなかったとき高温において、増殖性の高い細胞を取得することに成功し、得られた培養細胞中には新規な抗酸化性配糖体が生成されていることを見出し本発明を完成したのである。

【0026】本発明の高温で旺盛に増殖する培養細胞の育種及び培養細胞より生成される新規抗酸化性配糖体の抽出、精製及び構造決定について以下に述べる。

【0027】先ず、ごまとしては、芽、根、又は種子を用いる。そして、無菌条件下で芽ばえを調製し、芽、茎、葉及び／又は根の切片を固体及び／又は液体の培地で培養してカルス細胞を誘導する。得られた増殖性カルスは、継代培養することにより大きなカルスを成長させる。次いでこれを固体及び／又は液体培養で、静置及び／又は攪拌培養してカルス細胞を増殖せしめるのである。

【0028】培地としては、各種培地を使用することができ、炭素源としては、グルコース、フラクトース等の単糖類、マルトース、シュクロース等の二糖類のほか、オリゴ糖や澱粉等の多糖類も使用することができる。窒素源としては、硝酸、硝酸カリウムといった硝酸態窒素、硫酸、酒石酸アンモニウム等のアンモニア態窒素のほか、カザミノ酸、アミノ酸、ペプトン、コーンステープリカー、酵母菌体、イーストエキストラクト、麦芽エキストラクト等が使用できる。

【0029】そのほか、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、サイアミン、葉酸、ピオチン等のビタミン類；イノシトール、アデニル酸、グアニル酸、シチジル酸、チミジル酸、サイクリックAMP等の核酸関連物質；鉄、マンガン、亜鉛、ホウ素、ヨウ素、カリウム、コバルト、マグネシウム、モリブデン、リン、銅等のミネラルも使用する。

【0030】基本培地の1例を示すと、次の表1に示される第1表のとおりである。

【0031】

\* \* 【表1】

第1表 基本培地

硝酸アンモニウム	1,650mg
硝酸カリウム	1,900
塩化カルシウム	440
硫酸マグネシウム	370
リン酸第1カリウム	170
ホウ酸	6.2
硫酸マンガン	22.3
硫酸亜鉛	8.6
ヨーソカリウム	0.83
モリブデン酸ナトリウム	0.25
塩化コバルト	0.025
硫酸銅	0.025
エチレンジアミン4酢酸ナトリウム	37.3
硫酸第1鉄	27.8
ミオイノシトール	100
グリシン	2
塩酸ピリドキシン	0.5
ニコチン酸	0.5
塩酸チアミン	0.1
蔗糖	30g
水	1,000ml
pH 5.7	

【0032】基本培地にはオーキシン、サイトカイニン  
を添加するのが好ましく、オーキシンとしては、インド  
ール酢酸、インドール酪酸、フンタレン酢酸、2,4ジ  
クロロフェノキシ酢酸などが適宜利用される。また、サ  
イトカイニンとしては、ベンジルアデニン、カイネチン  
などが使用できる。これらの植物ホルモンやサイトカイ  
ニンは単独でも使用できるが、組合せて用いることが効  
果的である。増殖性のカルスの培養には、先の第1表に  
示した組成の培地でもよいが、さらに増殖性を改善する  
ためには、ココナツミルク、カゼイン加水分解物、ジャ  
ガイモ抽出液、コーンステーパーリカー、イーストエキ  
ストラクト、麦芽抽出液などの天然有機栄養源を添加す  
ることが有効である。培養温度は28～37℃で培養操  
作できるが、好ましくは33～36℃である。培養液の  
pHは弱酸性(pH5.6～6.0)が増殖に有利であ  
る。

【0033】このようにして得られたごまのカルス細胞  
から高温で安定に増殖できる細胞を育成するには、ジ  
ェランガムまたは寒天による固体平板培地に細胞の小塊  
を移植し、これを後記の増殖条件で1～2週間培養を行

なう。このときの培養温度は33～36℃に維持するこ  
とが好ましい。

【0034】さらに、多数の高密度培養細胞の培養系統  
の中より、増殖性の高い培養系統を選択し、その細胞集  
団から、更に細胞の小塊を多数取り出し、これらを新し  
い培地に移植することによって、更に多数の培養系統を  
作る。こうした細胞の培養系統の継代培養を5～10  
回、33～36℃の高温で、くり返すことによって、  
高温で安定に増殖できる、ごま培養細胞を育成する。

【0035】培養して得た増殖性細胞から抗酸化性物質  
を抽出するには、セルラーゼやリゾチームを用いる生物  
学的処理、化学的処理、機械的ないし超音波などの処  
理、又はこれを組合せたりして細胞を破壊し、メタノ  
ール、エタノール、アセトン、クロロホルムその他の有  
機溶媒、水などの単独ないしは、これらの有機溶媒と水  
との混合液で抽出して回収できる。

【0036】抗酸化性物質の活性の分析は、リノール酸  
を反応基質とする空気による自動酸化量をロタン鉄法に  
よって測定する方法を用いる。この方法は、脂質の過酸  
化を調べるのに用いられる常法である。(アグリカルチ

ュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry) 第45巻、735頁 (1981年)

【0037】次に本発明により育種され、高温度培養ができる、ごま培養細胞の取得について実験工程を追って詳細に説明する。

【0038】

【1. 無菌的に生育したごま芽ばえの調製】ごま種子を、よく水洗したのち、75%エタノール水溶液に数秒間浸漬する。これを別に用意した殺菌水で洗浄し、ついで0.1%ベンザルコニウムクロライド (市販殺菌剤) 液に2~5分間浸漬して種子に付着している微生物を殺菌する。この種子を再び殺菌水でよく洗浄したのち、1%次亜塩素酸ナトリウム (和光純薬製) (0.1%の界面活性剤ツイーン20を含む) の殺菌剤液によって、30分間処理して、ごま種子を完全に殺菌する。

【0039】いっぽう、殺菌した、ふた付きの広口容器 (プラスチック製市販品) を用意する。これに前記第1表に示した組成の基本培地 (ただし蔗糖は添加せず、固化剤として寒天の場合0.8~1.5%、ジュランガムの場合0.2~0.3%を添加した) を別途オートクレーブ殺菌したものを、広口容器に注いで固化させ播種用の固型培地とする。また、殺菌水と殺菌したガーゼを、広口容器に無菌的に入れて、播種用の床としてもよい。このような播種用の培地又は床に、殺菌処理したごま種子を無菌操作によって播種する。28~30℃の恒温室内で蛍光灯の光のもとで保温すると、殺菌処理したごま種子は死滅することなしに、発芽し、10日間程度で長さ3~5cmのごま芽ばえが調製できる。このごま芽ばえは、完全に無菌状態であり、増殖性細胞の育種に利用される。

【0040】

【2. ごま由来の増殖性細胞塊の誘導培養】前記第1表に示した組成の基本培地に、オーキシニンとして、ナフタレン酢酸 ( $10^{-8} \sim 10^{-5} M$ )、あるいは、2,4ジクロロフェノキシ酢酸 ( $10^{-8} \sim 10^{-5} M$ )、サイトカイニンとして、ベンジルアデニン ( $10^{-8} \sim 10^{-4} M$ )、あるいはカイネチン ( $10^{-8} \sim 10^{-4} M$ ) を組合せて添加した、各種組成の培地を調合する。これに、固化剤としてジュランガム0.2%または寒天0.8%を加えて、pHを5.7に調整したのち、微生物培養に常用されるペトリディッシュに分注して固化する。これに、先に述べたように無菌的に調製したごまの芽ばえの断片を移植し、温度28~30℃の恒温室内又は恒温箱の中で、暗所で培養を行なうと、培養2~3週間後には、ごま芽ばえの切断片の切り口より、細胞が増殖し、塊となってカルスを形成する。この増殖性のカルスを、同一組成の培地に継代培養することによって、大きなカルスを育てることができる。

【0041】カルスの人工的な誘導に用いる基本培地は第1表に示した培地組成 (ムラシゲースクークの培地) を用いたが、植物の細胞培養に通常用いられている培地ならいずれも使用できる。こうした培地の基本組成は、当業界においてよく知られている (植物細胞培養マニュアル、講談社 (1984))

【0042】

【3. カルス細胞の増殖培養細胞の育成】ごまの芽ばえより誘導した増殖性細胞塊 (カルス) は、第1表に示した組成の培地、ナフタレン酢酸 ( $1 \sim 5 \times 10^{-5} M$ )、ベンジルアデニン ( $1 \sim 5 \times 10^{-5} M$ )、などのオーキシニンやサイトカイニンを添加したものに、更に固化剤としてジュランガム0.2%又は寒天0.8%を加えて滅菌、固化した培地を用いて、安定に増殖する細胞を育成する。

【0043】ごま細胞は暗所でもよく増殖するが、明所の方が、更に増殖に活発である。したがって3,000~30,000ルクス、好ましくは8,000~15,000ルクスの明所においてよく増殖することが観察される。温度は、30~37℃でも増殖するが、好ましくは、33~36℃で培養することができる。

【0044】ごまのカルスから高温度で安定に増殖できる細胞を育成するには、ジュランガム又は寒天による固体平板培地に細胞の小塊を移植し、これを前記の増殖条件で1~2週間培養を行なう。

【0045】このときの培養温度はカルス細胞の誘導培養に用いた温度よりも高温度にする。すなわち培養温度を33~36℃に維持して、旺盛に増殖する細胞を濃縮することができる。

【0046】このようにして得た多数の培養系統の中より、増殖性の旺盛な培養系統を選択し、その細胞集団から、更に細胞の小塊を多数取り出し、これらを新しい培地に移植することによって、再び多数の培養系統を調製する。こうした細胞の培養系統の継代培養を5~10回くり返すことによって、33~36℃の高温度で安定に増殖できる。ごま細胞を育成する。

【0047】

【4. 増殖性細胞の培養】安定に継代培養が可能なごま細胞の増殖培養には、第1表に示した組成の培地が用いられるが、植物細胞の培養に通常よく用いられている組成の培地も利用できる。このような基本培地に、オーキシニンとして、ナフタレン酢酸 ( $1 \sim 5 \times 10^{-5} M$ )、サイトカイニンとして、ベンジルアデニン ( $1 \sim 5 \times 10^{-5} M$ ) を加えたものを調合する。液体培養の場合にはそのまま増殖培養に使用できるが、固体培地での培養の時には、これにジュランガム0.2%又は寒天0.8%を加えて、滅菌、固化させて使用する。細胞の増殖には光を照射するのが有利である。通常3,000~30,000ルクス、好ましくは8,000~15,000ルクスの照射であればよい。温度は28~37℃で増

殖するが好ましくは33～36℃でよく増殖培養ができる。液体培養は、通常の微生物の培養に用いられる振とう培養法や通気攪拌培養法が適用できるが、微生物の培養に比較して、ゆるやかな条件で操作するのが好ましい。微生物の培養に比較して、酸素の必要量は著しく少なくてもよいから、わずかに空気を通気しつつ、細胞が培養液の底に沈でんしない程度の攪拌を行うことが増殖に好ましい。

【0048】増殖培養を更に効果的に行なうためには、培養液のpHを5.6～5.8に維持するのがよい。

【0049】通常の増殖培養では、1～2週間で培養が終了するから、培養液から細胞を遠心分離法などの常法で回収することが可能である。また固体培養の場合には、増殖した細胞塊は容易に回収できる。

【0050】かくして、工業的な規模で、生産が可能なごま細胞の育成を行い、これを多量に増殖培養することが出来るのである。

【0051】このような操作によって取得された高温度培養が出来るごま培養細胞の増殖量と培養温度との関係を図4に示す。植物細胞を通常培養する時に用いられている25～28℃の温度における増殖量に比べて、35～36℃では、約2倍以上の増殖量を示しており増殖速度も早くなることから工業的な植物細胞の培養において、有効に使用できるものである。

【0052】

【5. 抗酸化性物質の抽出及び分析】上記によって得た増殖性のカルス細胞を、ブレンダー等で細かく破碎したのち、石英砂と共に磨砕する。これをメタノールなどの溶媒で抽出し、無水硫酸ナトリウムによって脱水し、30～35℃で蒸発乾固する。再びメタノールに溶解させて、抗酸化性物質を含んだ分画を得る。

【0053】次に抗酸化活性の分析法について述べる。リノール酸を反応基質とする方法であり、油脂の酸化の程度を測定するためによく用いられているロダン鉄法を利用するものである。即ち油脂の自動酸化により生成する過酸化物質によって二価鉄イオンが三価鉄イオンに酸化され、これがチオシアン酸アンモニウムと反応し赤色のロダン鉄を生成させ、その吸光度を測定することから、油脂の過酸化物質の量を求める方法である。(アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー)

(Agricultural and Biological Chemistry, 第45巻、735頁(1981年))

【0054】また、ロダン鉄法に比較してより生体系に近い分析法として兎赤血球膜脂質の過酸化反応を利用した、いわゆる赤血球ゴースト法も併せて使用した。

【0055】兎の赤血球から、その膜のみを調製し、これを赤血球ゴーストと呼ぶ。

【0056】この赤血球ゴーストに、酸化の開始剤として、 $t$ -ブチルヒドロキシパーオキサイドを加えて、

赤血球膜のリン脂質の過酸化反応を促進させたのち、生成するマロンジアルデヒドあるいは、これに類似した物質を、チオバルビツール酸で発色させ、その吸光度を測定するのである。(バイオケミストリー、78巻、6858頁(1981年))

【0057】反応系に添加されるサンプル中の抗酸化活性の程度によって、チオバルビツール酸による発色度に変化するから、抗酸化性物質を含まない対照区と比較することによって、サンプル中に含まれている抗酸化活性を測定することができる。

【0058】

【6. 新規抗酸化性配糖体の抽出、分離及び構造解析】液体培養法によって増殖した細胞は、重力分離法や遠心分離法によって容易に回収することができる。得られた細胞を最終濃度が80%になるようにエチルアルコールを添加し、機械攪拌ホモジナイザーによって抽出する。遠心分離して抽出液を回収した残りの細胞について再び80%エチルアルコールで抽出する。得られた抽出液を減圧下で濃縮して乾固すればアメ状、黄褐色の抗酸化性物質の粗抽出物が得られる。

【0059】これを、たとえばアンバーライトXAD-I Iを用いる吸着クロマトグラフ法によって、樹脂に吸着させ、水とメタノールの混合溶媒によって溶出し、抗酸化活性のある画分を取得する。メタノール60%水溶液により溶出する分画を集め、これを減圧濃縮することにより、ごま培養細胞中に含まれている抗酸化性物質の代表的な成分を得る。

【0060】天然物化学の技術分野で、通常用いられている高速クロマトグラフ法により、含有成分の分離分析を行うことによって、目的成分の精製程度を検定する。ごま培養細胞のアルコール抽出物の吸着クロマトグラフ法により60%メタノール水溶液で溶出したフラクションの高速液体クロマトグラフのチャート図を図5に示す。

【0061】多数のピークの中より、強い抗酸化活性をもつピークを更に精製する。この時、天然物の精製法として通常用いられている、高速液体クロマトグラフ法を、くり返し使用して、順次目的物質を純化する。図6に、高速液体クロマトグラフ法により精製した抗酸化性物質の単一性を示す。

【0062】単一な成分として単離された抗酸化性物質について機器分析を行い、その化学構造を以下のように決定した。

【0063】まず、単離された抗酸化性物質の紫外線吸収スペクトラムを、図7に示す。得られた紫外線吸収スペクトラムは、いずれも、カフェ酸系化合物の特徴とよく符号していた。

【0064】次に高速電子衝突質量分析法(FAB-MS)により解析し、図8に示すようなマススペクトラムを得た。これより、分子イオンピーク(M-1)<sup>-</sup>は6

67であり、抗酸化性物質の分子量は668と判明した。またプロトン核磁気共鳴法(NMR)により、二置換 $\alpha$ -オレフィン、2つの芳香族環の存在と置換様式が解明された(図9)。

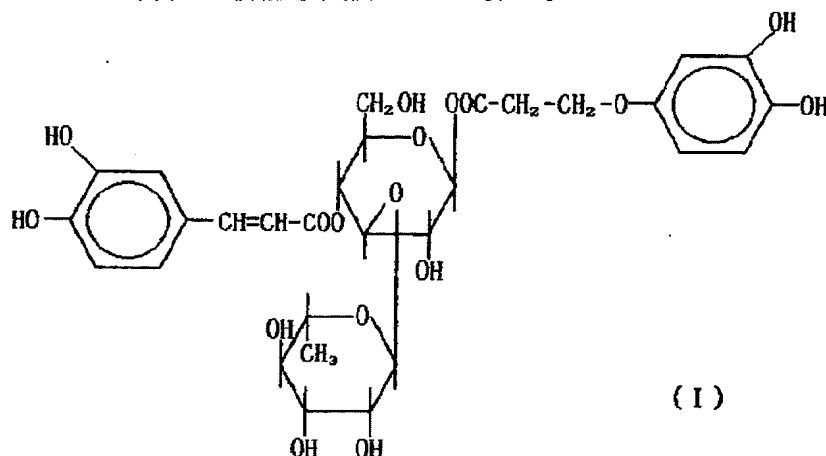
【0065】精製した抗酸化性物質は、糖の呈色反応により糖分子が結合した配糖体であることが判っていたが、その構造を決定するために炭素13核磁気共鳴法に\*

\*より構造の解析を行った。そのスペクトラムを図10に示す。

【0066】こうした天然物の構造解析法を駆使して、ごま培養細胞由来の抗酸化性物質の構造を下記の化3で示される構造式(1)と決定した。

【0067】

【化3】



【0068】

【7. 新規抗酸化性配糖体の抗酸化活性】ごま培養細胞から80%エタノールで抽出して得た粗抽出物、これをアンバーライトXAD-Iによる吸着クロマトグラフ法により60%メタノール水溶液で溶出して得た中間精製物、さらに、中間精製物を高速液体クロマトグラフ法により単一ピークまで精製した抗酸化性配糖体は、前述の兎赤血球ゴースト法により、抗酸化活性を測定した結果を図11にそれぞれ示した。横軸は分析における反応系に添加したサンプルの濃度を取り、縦軸に、チオバルビツール酸による発色度を、抗酸化性物質を無添加の対照区を100%として相対比率で示した。市販されている合成抗酸化剤ブチルヒドロキシアニソール(BHA)を抗酸化剤の対照区に用いて比較したものである。

【0069】このように、この培養細胞から抽出して得た抗酸化性配糖体は、BHAにほぼ相当する抗酸化活性をもっていることがわかった。

【0070】抗酸化剤として工業的に抗酸化性配糖体を応用する時には、目的に応じて精製品や粗製品を使用することが便利である。

【0071】このことは図11に示したように、純品にまで精製した標品と、吸着クロマトグラフ法によって得られた中間精製品の抗酸化活性に大きな差はなく、厳密に考えると中間精製品に含まれている、単離した抗酸化性配糖体以外の成分にも抗酸化活性が認められたり、また、共存物質による抗酸化活性の促進作用(相乗作用)が考えられる。こうしたことは、粗製品でも使用できることを十分に示唆するものである。

【0072】したがって本発明に係る抗酸化剤は、構造

式(1)で示される化合物を有効成分として含有するものがすべて包含されるものであり、ごま培養細胞から抽出して得られる精製品はもとより、それまでに至る各段階によって得られる半精製品、粗製品をすべて包含するものである。

【0073】本発明に係る化合物は、配糖体であるが、配糖体の構造をもっていることは、水溶性と脂溶性の双方の特性を示すことが特徴として考えられ、したがって本発明化合物は、水溶性のビタミンC、脂溶性のビタミンEやブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)などに比較して、抗酸化剤としての使用範囲が拡大され、また生体内での作用においても、有利性が大いに期待される。

【0074】以下に実施例及び試験例をもって本発明を説明するが、これらは例示であって、本発明を制限するものではない。

【0075】なお、本発明に使用する各細胞は、通常のごま植物を用い、前記した手法及び後記する実施例の手法にしたがってごま成体細胞をそれぞれ処理すれば容易に取得することができ、十分に再現性があることが確認された。原料の入手にも何の困難性もなくその処理にも格別の困難は無いので、本発明に使用する細胞は、何人も容易に入手することができるのである。

【0076】

【実施例1】(1)ごま(*Sesamum indicum* L.)の種子を用意し、これを75%エタノール液に数秒間浸漬したのち、殺菌した蒸留水で2回水洗した。これを0.1%ベンザルコニウムクロライド塩(甘槽化学産業(株)製)に2分間浸漬した。殺菌した蒸留



水で3回よく洗浄したのち、1%次亜塩素酸ナトリウム（和光純薬）、0.1%ツイーン20（和光純薬）を含む殺菌剤液に30分間浸漬し、殺菌水で水洗して殺菌ごま種子を調製した。

【0077】植物培養用のプラスチック製容器（フロー・ラボラトリー社製）に殺菌水と殺菌したガーゼを入れ、その上に、予め殺菌したごま種子を播種した。30℃の恒温室で20ワットの蛍光灯の光のもとで2週間放置したところ、長さ5～7cmのごま芽ばえが得られた。

【0078】（2）第1表に示した組成の培地21を調製し、これを等分し、それぞれの100mlに、ジュランガム（三栄化学工業製）0.2%と、表2に示した実験条件のサイトカイニン、オーキシンを添加して、増殖性細胞塊（カルス）の誘導培地とした。これらを常法に

したがい120℃、10分間のオートクレーブ殺菌処理をした。

【0079】これらの培地を、温かいうちに、直径10cmのプラスチック製ペトリディッシュにそれぞれ3枚宛30mlずつ分注し、室温で固化させた。

【0080】これに（1）で調製した、ごま芽ばえを無菌操作によって、茎、葉を5～7mmの切片に切断して、ペトリディッシュの固型培地上に移植した。水分の蒸発を防止するためパラフィルム（アメリカン・カン社製）で封をし、28～30℃の恒温室に暗所で3週間放置してごま芽ばえ切片からのカルスの誘導を行ない、表2で示される第2表の結果を得た。

【0081】

【表2】

第2表

サイトカイニン	オーキシシン	カルスの誘導状態
ベンジルアデニン $1 \times 10^{-5} M$	ナフタレン酢酸	
	$5 \times 10^{-5} M$	++++
	1	+++
	0.1	++
	0.01	-
2, 4ジクロロフェノキシ酢酸		
	$5 \times 10^{-5} M$	-
	1	+
	0.1	++
	0.01	++++
カイネチン $1 \times 10^{-5} M$	ナフタレン酢酸	
	$5 \times 10^{-5} M$	++++
	1	++++
	0.1	+++
	0.01	-
2, 4ジクロロフェノキシ酢酸		
	$5 \times 10^{-5} M$	+
	1	+
	0.1	+++
	0.05	++++

+: カルス誘導の量を示す。+印が多いほど良好である。

-: カルス誘導なし。

【0082】(3) 第1表の組成の基本培地に、ジュランガム0.2%、ナフタレン酢酸 $5 \times 10^{-5} M$ 、ベンジルアデニン $1 \times 10^{-5} M$ を添加した培地600mlを、(1)と同様にして殺菌調製した。これをプラスチック製ベトリディッシュ20枚にそれぞれ30ml宛分注して固化させた。(1)で誘導培養して得た増殖性カルスを、ベトリディッシュ当り4ヶ宛移植した。33~36℃、12,000ルクスの光の植物細胞培養装置の中で、2週間培養を行った。増殖性の良好な細胞集塊を選抜し、これを種細胞として、33~36℃で継代培養を4回くり返した。かくして、高温度で安定に増殖する培養細胞を育成した。この細胞をN<sub>5</sub>B<sub>5</sub>S-HT(ナ

フタレン酢酸 $5 \times 10^{-5} M$ 、ベンジルアデニン $1 \times 10^{-5} M$ で継代培養したごま培養細胞)と命名した。

【0083】(4) 第1表の組成の基本培地にジュランガム0.2%、ナフタレン酢酸 $5 \times 10^{-5} M$ 、ベンジルアデニン $1 \times 10^{-5} M$ を添加した培地1lを、

(1)と同様にして殺菌調製した。これを直径4cm、深さ13cmの植物細胞培養用のガラス製容器に40ml宛分注して固化させた。(3)で継代培養して育成したごまの増殖性細胞N<sub>5</sub>B<sub>5</sub>S-HT細胞の5~7mm角を移植して35~36℃、12,000ルクスの光の植物細胞培養装置の中で10日間培養を行った。その結果、培養容器中に増殖した細胞の生重量は平均14.5

gであった。

【0084】この細胞のうち60gを乳ばちに取り、6gの石英砂を加えて5分間磨砕したのち80%エタノール水溶液200mlを加えてよく攪拌し抗酸化性物質を抽出した。これを遠心分離(2,500回転/分、10分間)して上澄液を集め、細胞残渣には再び200mlの80%エタノール水溶液を加えて抽出した。3回のエタノール水溶液による抽出液を集め40℃でロータリエバポレーターにて蒸発乾固し、黄褐色の抽出物4.8gを取得した。

【0085】

【実施例2】第1表に示した組成の培地31を、通気攪拌装置を備えた51容量の植物細胞培養槽に入れ、オートクレーブによって、120℃、2分間加圧殺菌した。別の300ml三角フラスコに第1表に示した組成の培地60mlを入れ、同様に殺菌したものに、ごま培養細胞のシードを添加し、35℃、蛍光灯の光照射下で、振とう数60往復/分の条件で振とう培養した。7日間培養したフラスコ5本分の培養細胞を無菌操作によって回収し、植物細胞培養槽に接種した。植物細胞培養槽の培養条件は、攪拌数30回転/分、pH5.7±0.1、通気量1.5l/分、光照射8,000ルクス、温度35℃で10日間培養した。培養終了液を遠心分離して、細胞を回収したところ、乾燥重量として39gが取得された。

【0086】培養して得られたごま細胞を生重量として500gを用いて抗酸化性物質の抽出精製を行った。すなわち1.9lのエタノールを加えて、ホモジナイザーにより攪拌しつつ20分間抽出したのち、濾過器によって細胞と抽出液を分離した。細胞残渣に2lの80%エタノール水を加え、同様に抽出操作を20分間行ったのち濾過器によって細胞残渣を分離し、更に2lの80%エタノールで抽出した。

【0087】抽出液を合せて、40℃で減圧濃縮を行い褐色の粗抽出物12.8gが取得された。

【0088】吸着クロマトグラフ法を用いるアンバーライトXAD-II樹脂を直径5cm、長さ40cmのガラス製カラムに充填して、水を流して平衡化した。これに抽出物5gをカラムの上部に樹脂に吸着させた状態で重層し、水から順次メタノール濃度を増加させる段階溶出法によって、目的物質の溶出を行った。60%メタノールで溶出される分画を集め、40℃で減圧濃縮したところ、黄褐色の中間精製物の184mgが得られた。これを高速液体クロマトグラフ法を繰返して、単一ピークになるまで精製を行った結果、精製物として抗酸化性配糖体が18mg得られ、その化学構造を構造式(I)で示されるものであることを確認した。

【0089】実施例で得られた、この粗成分、中間精製物、および精製物について、それらの抗酸化活性を兎赤血球ゴースト法により測定したところ、図11に示すよ

うに、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)とはほぼ同程度の強い抗酸化活性が認められた。

【0090】

【試験例1】本発明によって調製した抗酸化性配糖体のすぐれた抗酸化効果を次のようにして確認した。

【0091】実施例によって得た抽出物100mgを100mlの80%エタノール水溶液に溶かし(1mg/1ml濃度)、抗酸化性物質の分析サンプルとした。これの1mlをサンプルとしてリノール酸の自動酸化の抑制の程度をロダン鉄法によって測定した。その結果、図12からも明らかなように、ごま増殖細胞から抽出した画分(1mg)には、 $\alpha$ -トコフェロール(0.2mg)あるいは、ブチルヒドロキシアニソール(BHA、0.2mg)に相当する高い活性の抗酸化性物質が含まれていることが確認された。

【0092】

【発明の効果】本発明は、高温増殖性ごま細胞を培養容器の中で多量に調製し、それによって、ごま細胞中に含まれている新規抗酸化性配糖体を工業的に大量に生産することを可能としたものである。したがって本発明の方法によれば、栽培によらず工業的な手段によって、安全な食品、医薬品、化粧品として使用される天然物由来の新規抗酸化性配糖体を計画的に且つ大量に供給することができるという著効が奏されるのである。

【0093】また本発明によって新規抗酸化性配糖体の化学構造が解明されたので、これを化学的に修飾、変形することにより更に新規化合物の創製、新規抗酸化性物質の開発が可能となる。そして更に、化学合成法による本化合物の製造法の確立も期待され、抽出法よりも更に工業的に本化合物を大量生産することも可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】多価不飽和脂肪酸(PUFA)の自動酸化機構を図示したものである。

【図2】フェノール性抗酸化性物質の構造を図示したものである。

【図3】ごまから単離された抗酸化性物質の構造を図示したものである。

【図4】高温培養細胞の増殖量と培養温度との関係を示すグラフである。

【図5】吸着クロマトグラフ法で溶出した中間精製品の液体クロマトグラフ法による含有成分の組成を示す図面である。

【図6】液体クロマトグラフ法により精製した抗酸化性物質のクロマトグラムである。

【図7】精製した抗酸化性物質の紫外線吸収スペクトラムである。

【図8】精製した抗酸化性物質の高速電子衝突マスペクトルによる解析図である。

【図9】精製した抗酸化性物質のプロトン核磁気共鳴法によるスペクトラムである。

【図10】精製した抗酸化性物質の炭素13核磁気共鳴法によるスペクトラムである。

【図11】兔赤血球ゴースト法によるごま培養細胞からの粗抽出物、中間精製物、精製物の抗酸化活性を示したものである。

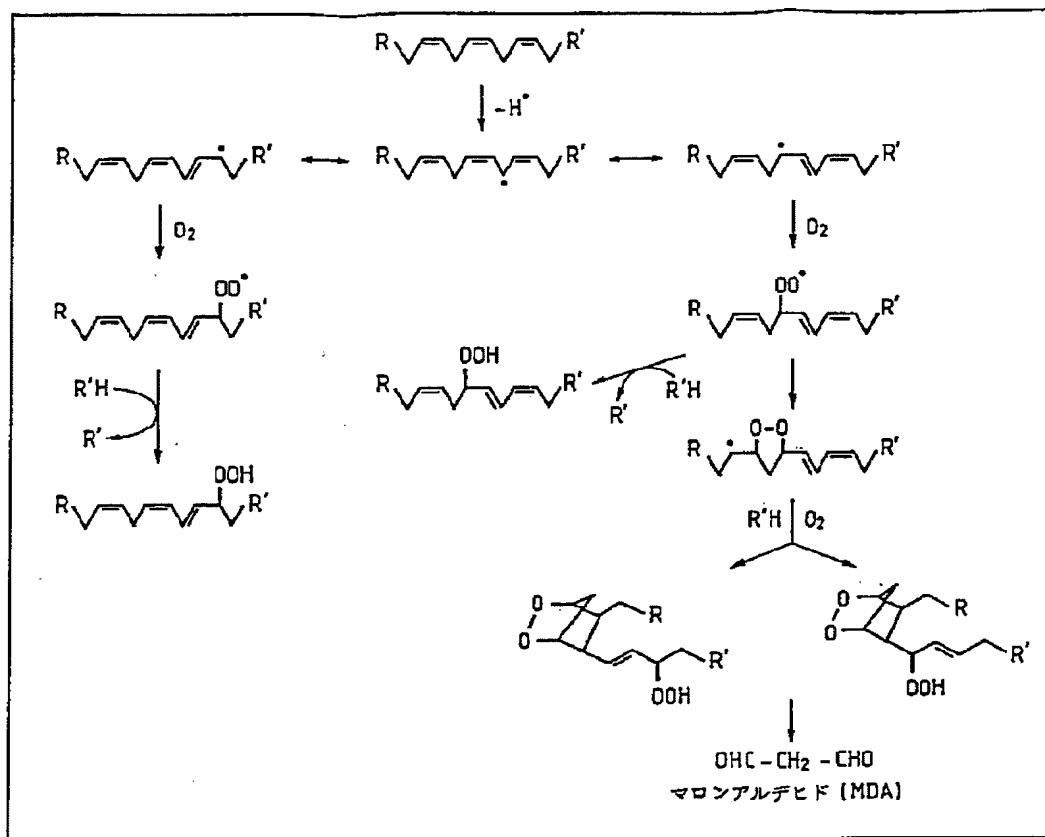
▲：粗抽出物  
●：中間精製物  
◆：精製物

\*○：ブチル・ヒドロキシ・アニソール (BHA)

【図12】リノール酸を反応基質とした自動酸化の経過をロタン鉄法により分析した、リノール酸の酸化曲線である。

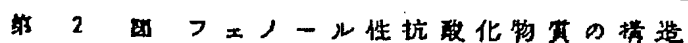
—●—：対照区  
—○—： $\alpha$ -トコフェロール区  
—△—：ブチルヒドロキシアニソール区  
\* —◎—：ごま細胞よりの粗抽出物

【図1】

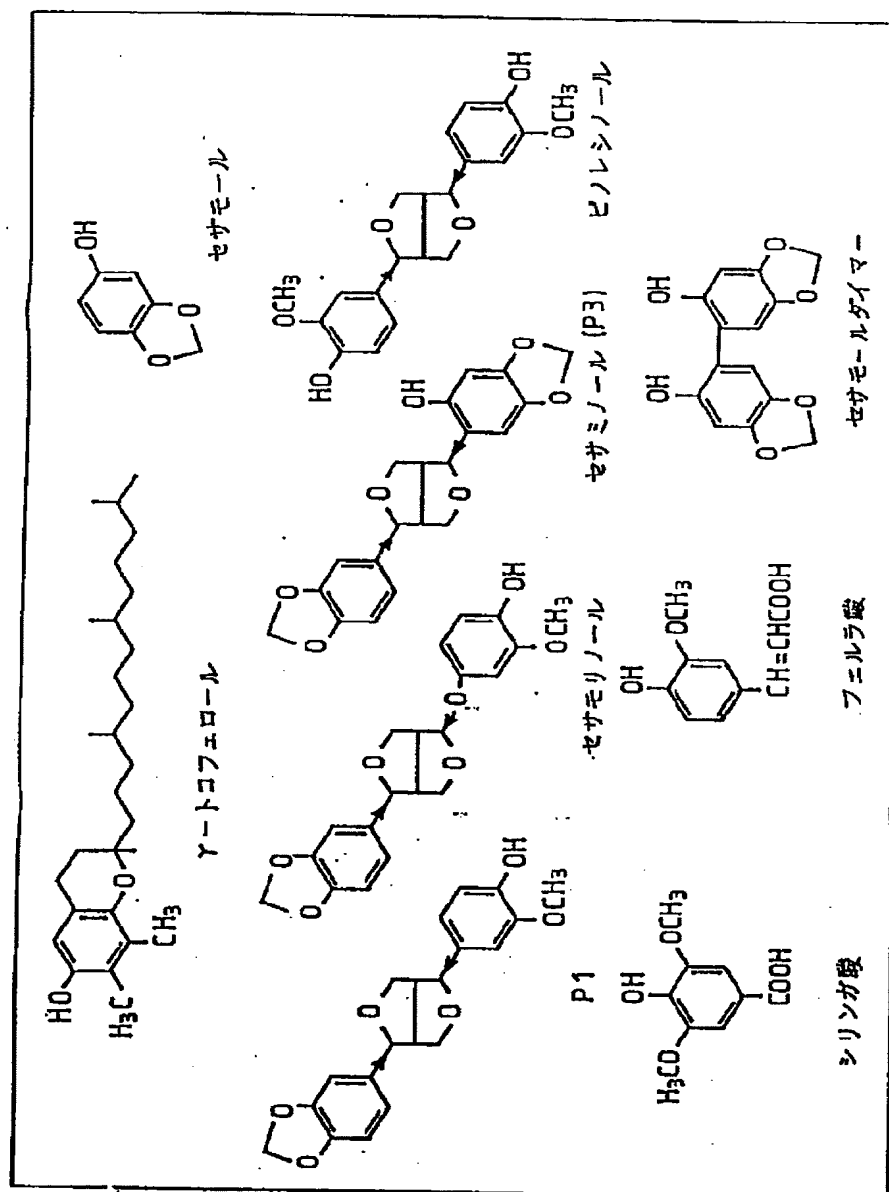


第 1 図 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の自動酸化機構

【図2】



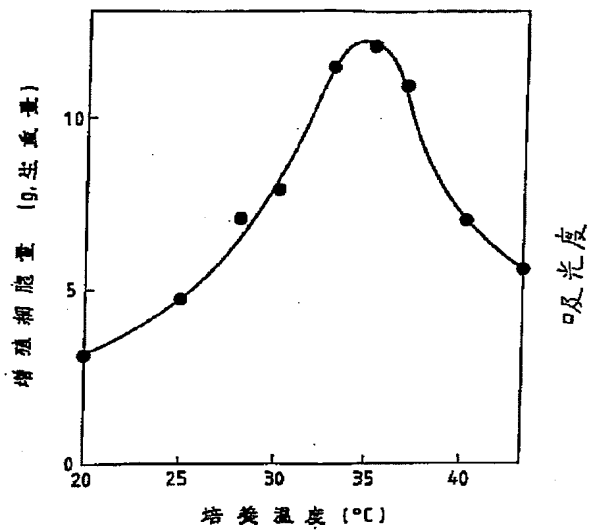
【図 3】



3 聚 図 ガマカから単離された炭酸物質の構造

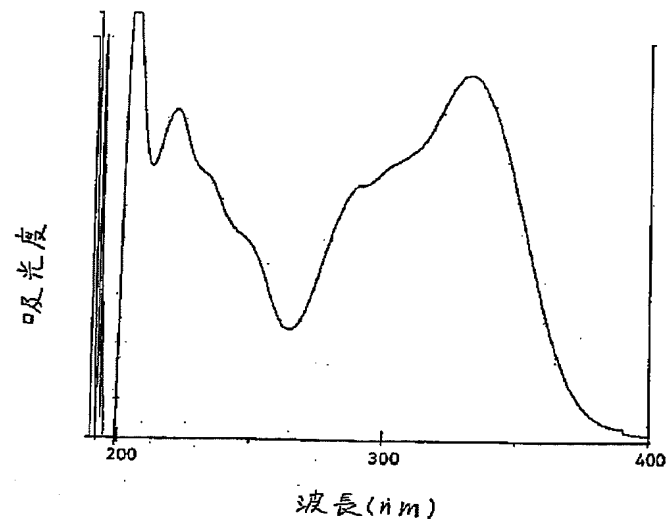
【圖4】

第 4 圖



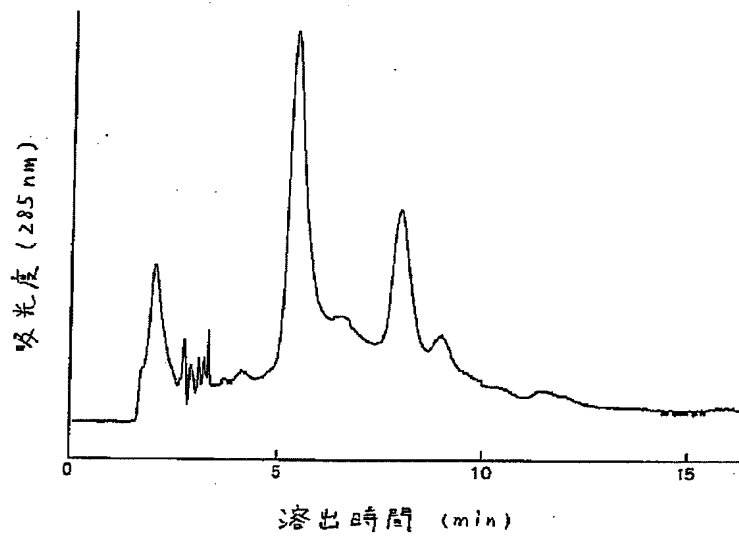
【圖7】

第7圖



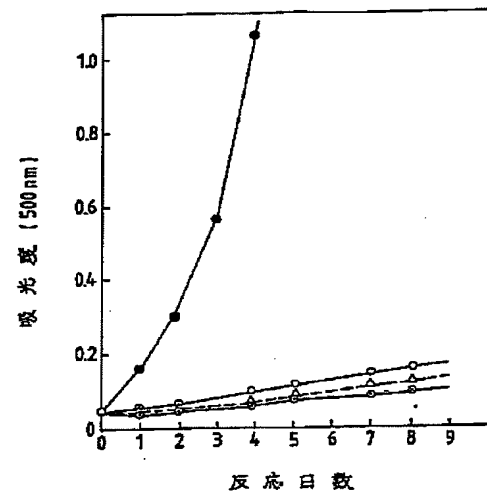
【圖5】

第 5 圖



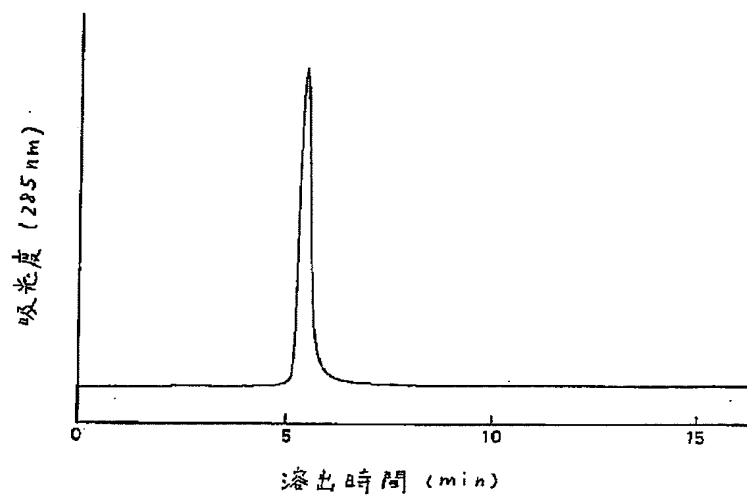
【圖12】

第 12 圖



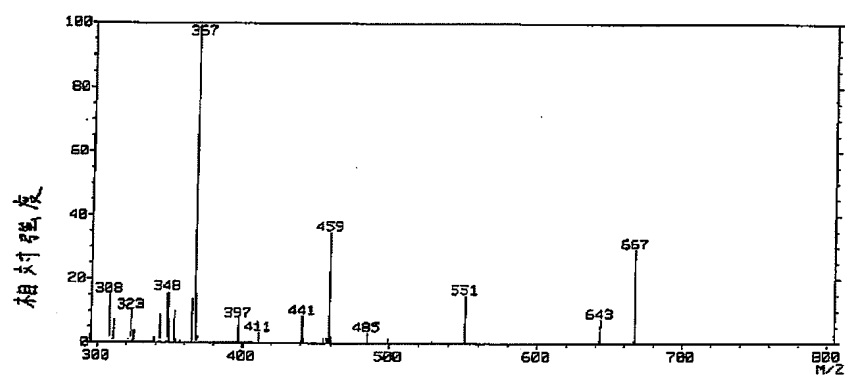
【図6】

第6図



【図8】

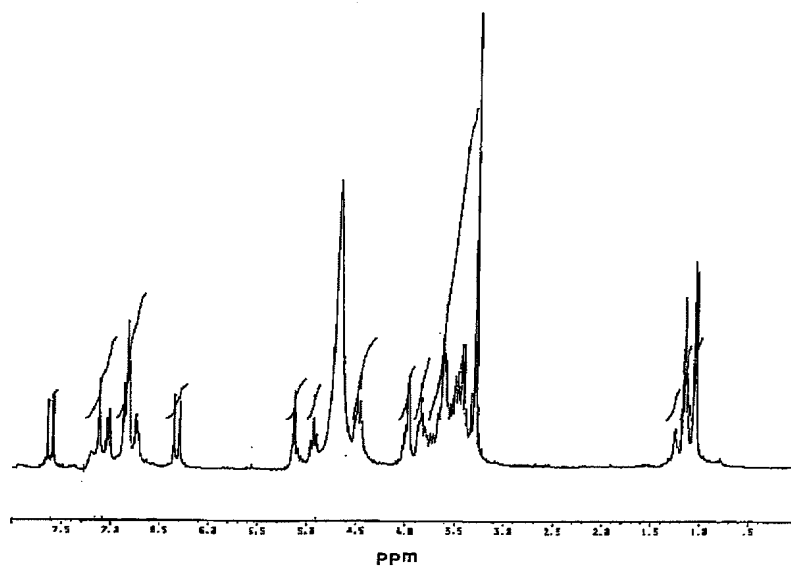
第8図





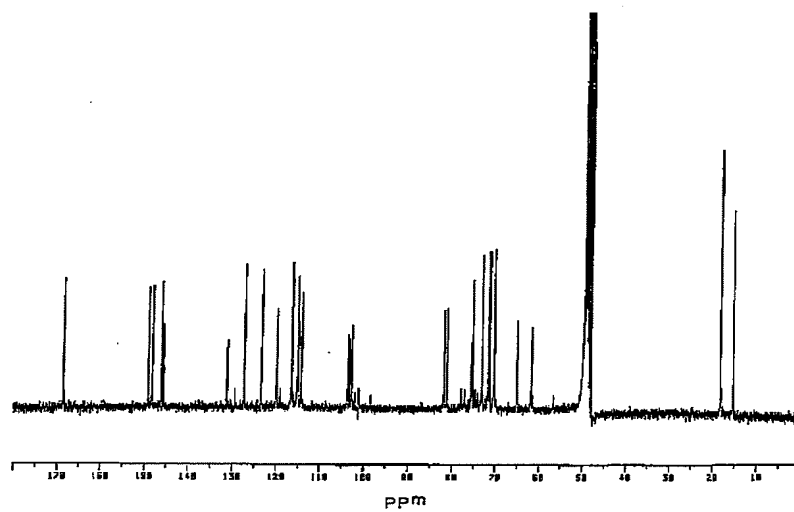
【図9】

第9図



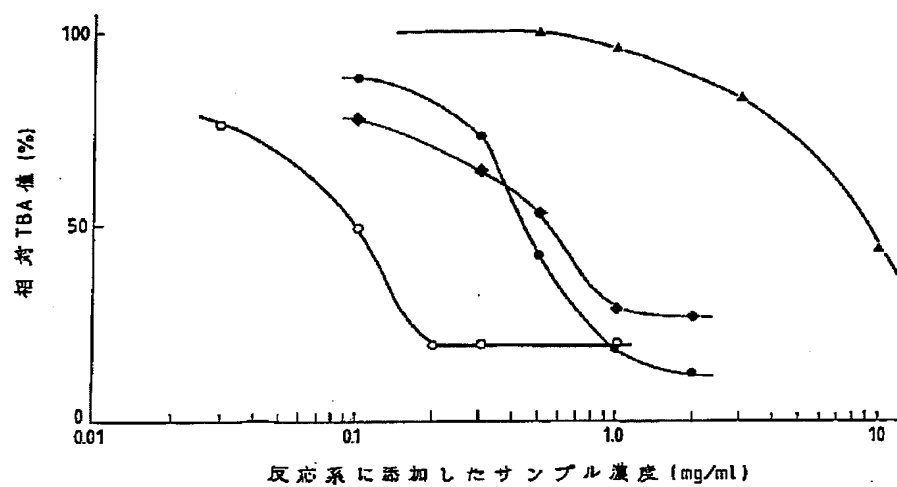
【図10】

第10図



【図11】

第 11 図



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

// A 6 1 K 7/00

47/26

C 1 2 N 5/04

(C 1 2 P 19/12

C 1 2 R 1:91)

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

F 7327-4C

K 7329-4C

## 【正誤表】

## 【公開番号】

特開平4-208228  
 特開平4-208256  
 特開平4-208263  
 特開平4-208282  
 特開平4-210956  
 特開平4-211644  
 特開平4-224559  
 特開平4-225992  
 特開平4-234832  
 特開平4-234860  
 特開平4-234861  
 特開平4-234864  
 特開平4-235996  
 特開平4-244097  
 特開平4-270288  
 特開平4-270289  
 特開平4-270291  
 特開平4-273816  
 特開平4-273818  
 特開平4-273888  
 特開平4-273898  
 特開平4-279570  
 特開平4-279588  
 特開平4-283519  
 特開平4-297467  
 特開平4-297485  
 特開平4-300815  
 特開平4-300867  
 特開平4-305529  
 特開平4-308589  
 特開平4-320029  
 特開平4-327585  
 特開平4-330055  
 特開平4-330080  
 特開平4-330088  
 特開平4-352717  
 特開平4-356421  
 特開平5-9115  
 特開平5-32561  
 特開平5-32643  
 特開平5-39283  
 特開平5-51370  
 特開平5-124981  
 特開平5-163222  
 特開平5-170734  
 特開平5-279289  
 特開平5-279309  
 特開平6-25281

特開平6-40841  
 特開平6-41059  
 特開平6-65250  
 特開平6-65251  
 特開平6-135829  
 特開平6-211853  
 特開平6-316527  
 特開平6-345690  
 特開平7-138186  
 特開平4-209642  
 特開平4-216856  
 特開平4-218550  
 特開平4-227691  
 特開平4-246483  
 特開平4-255747  
 特開平4-270744  
 特開平4-288394  
 特開平4-309584  
 特開平4-311784  
 特開平4-314713  
 特開平5-5076  
 特開平5-17771  
 特開平5-25373  
 特開平5-59239  
 特開平5-255512  
 特開平6-16738  
 特開平6-73353  
 特開平6-87954  
 特開平6-145454  
 特開平6-200257  
 特開平6-220232  
 特開平6-248024  
 特開平4-210433  
 特開平4-221084  
 特開平4-224673  
 特開平4-301061  
 特開平5-70196  
 特開平5-209261  
 特開平4-209830  
 特開平4-370266  
 特開平5-195450  
 特開平6-17383  
 特開平6-228801  
 特開平4-254612  
 特開平4-281996  
 特開平5-18008  
 特開平5-98644  
 特開平6-26049  
 特開平6-26052  
 特開平6-17742

特開平4-273888

特開平7-49080  
特開平4-327044  
特開平4-331867

第3部門(2)

## 正 誤 表

(平成10年9月22日発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 4-208228	A61K 37/36		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成5年(1993)11月2日	平成4年(1992)7月29日
平 4-208256	C07C 229/06		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)10月25日	平成4年(1992)7月29日
平 4-208263	C07D 209/14		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)7月29日
平 4-208282	C07D 401/06		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)7月29日
平 4-210956	C07C 317/44		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成7年(1995)12月12日	平成4年(1992)8月3日
平 4-211644	C07C 317/22		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成5年(1993)11月2日	平成4年(1992)8月3日
平 4-224559	C07D 213/30		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)12月6日	平成4年(1992)8月13日
平 4-225992	C07F 15/00		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成5年(1993)11月2日	平成4年(1992)8月14日
平 4-234832	C07C 211/00		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)10月25日	平成4年(1992)8月24日
平 4-234860	C07D 265/34		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月8日	平成4年(1992)8月24日
平 4-234861	C07D 265/34		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月8日	平成4年(1992)8月24日

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 4-234864	C07D 277/32	A C V	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 4 年(1992) 8 月24日
平 4-235996	C07H 1/08		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 4 年(1992) 8 月25日
平 4-244097	C07K 5/08		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 4 年(1992) 9 月 1 日
平 4-270288	C07D 495/14		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日 平成 7 年(1995)12月12日	平成 4 年(1992) 9 月25日 平成 4 年(1992) 9 月25日
平 4-270289	C07D 498/14		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995)12月12日	平成 4 年(1992) 9 月25日
平 4-270291	C07C 513/14		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日 平成 7 年(1995)12月12日	平成 4 年(1992) 9 月25日 平成 4 年(1992) 9 月25日
平 4-273816	A61K 9/28		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 4 年(1992) 9 月30日
平 4-273818	A61K 31/215		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日 平成 7 年(1995)12月12日	平成 4 年(1992) 9 月30日 平成 4 年(1992) 9 月30日
平 4-273888	C07H 13/04		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月 8 日	平成 4 年(1992) 9 月30日
平 4-273898	C07K 5/06		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 4 年(1992) 9 月30日
平 4-279570	C07D 233/64	1 0 6	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)10月25日	平成 4 年(1992)10月 5 日

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 4-279588	C07D 477/00	8 0 0	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 4 年(1992)10月 5 日
平 4-283519	A61K 39/40	A B D	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 4 年(1992)10月 8 日
平 4-297467	C07D 265/30		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 4 年(1992)10月21日
平 4-297485	C07H 11/04		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 4 年(1992)10月21日
平 4-300815	A61K 7/16		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 4 年(1992)10月23日
平 4-300867	C07D 233/64	1 0 3	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)10月25日	平成 4 年(1992)10月23日
平 4-305529	A61K 31/725		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995)12月12日	平成 4 年(1992)10月28日
平 4-308589	C07D 417/04		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 5 年(1993)11月 2 日	平成 4 年(1992)10月30日
平 4-320029	A61K 7/075		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 5 年(1993)12月 3 日
平 4-327585	C07D 471/04	1 0 3	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 4 年(1992)11月17日
平 4-330055	C07D 209/44		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995)12月12日	平成 4 年(1992)11月18日

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 4-330080	C07F 9/09		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)12月6日	平成4年(1992)11月18日
平 4-330088	C07F 9/855		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)11月18日
平 4-352717	A61K 7/50		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)12月7日
平 4-356421	A61K 31/557		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)12月10日
平 5- 9115	A61K 31/21	A B S	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成5年(1993)1月19日
平 5- 32561	A61K 39/40	A C K	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)10月25日	平成5年(1993)2月9日
平 5- 32643	C07D 265/36		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成5年(1993)2月9日
平 5- 39283	C07D 309/32		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成5年(1993)2月19日
平 5- 51370	C07D 267/14		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成5年(1993)3月2日
平 5-124981	C07C 11/107		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成7年(1995)10月31日	平成5年(1993)5月21日
平 5-163222	C07C 235/38		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成7年(1995)12月12日	平成5年(1993)6月29日



特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 5-170734	C07D 207/16		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)10月25日	平成 5 年(1993)7 月 9 日
平 5-279289	C07C 49/603		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)10月25日	平成 5 年(1993)10月26日
平 5-279309	C07C 235/34		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995)3 月20日	平成 5 年(1993)10月26日
平 6- 25281	C07J 9/00		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月 8 日	平成 6 年(1994)2 月 1 日
平 6- 40841	A61K 6/083	5 0 0	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995)3 月20日	平成 6 年(1994)2 月15日
平 6- 41059	C07C 401/00		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995)10月31日	平成 6 年(1994)2 月15日
平 6- 65250	C07D 495/06		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 6 年(1994)3 月 8 日
平 6- 65251	C07D 495/10		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 6 年(1994)3 月 8 日
平 6-135829	A61K 31/19	A B N	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995)12月12日	平成 6 年(1994)5 月17日
平 6-211853	C07D 471/04	1 0 7	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995)2 月21日	平成 6 年(1994)8 月 2 日
平 6-316527	A61K 35/78	A A M	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995)10月31日	平成 6 年(1994)11月15日

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 6-345690	C07C 9/16		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成7年(1995)12月12日	平成6年(1994)12月20日
平 7-138186	A61K 39/12	A F F	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成7年(1995)12月12日	平成7年(1995)5月30日

## 第3部門(3)

## 正 誤 表

(平成10年9月22日発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 4-209642	C08L 27/06	N S K	全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)7月31日
平 4-216856	C08L 63/00		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)8月6日
平 4-218550	C08L 27/04		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)8月10日
平 4-227691	C11B 15/00	P H X	全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月8日	平成4年(1992)8月17日
平 4-246483	C09D 175/04		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)10月25日	平成4年(1992)9月2日
平 4-255747	C08L 33/02		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)9月10日
平 4-270744	C08L 23/00	L C U	全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)9月28日
平 4-288394	C09K 11/80	C P M	全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)10月13日
平 4-309584	C09J 7/02	J K E	全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)11月2日
平 4-311784	C09D 201/00	P D C	全文訂正後の公開公報 公開日	平成7年(1995)5月16日	平成4年(1992)11月4日
平 4-314713	C08F 283/04	M Q T	全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)11月5日

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 5- 5076	C09D 17/00	P U J	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 5 年(1993) 1 月14日
平 5- 17771	C09K 17/00	1 0 6	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 5 年(1993) 1 月26日
平 5- 25373	C08L 67/02		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月29日	平成 5 年(1993) 2 月 2 日
平 5- 59239	C08L 27/06	L E P	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)10月25日	平成 5 年(1993) 3 月 9 日
平 5-255512	C08H 1/00	N V D	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月 8 日	平成 5 年(1993)10月 5 日
平 6- 16738	C08F 261/04	M Q K	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 6 年(1994)11月15日	平成 6 年(1994) 1 月25日
平 6- 73353	C09J 101/26	J A E	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995) 2 月21日	平成 6 年(1994) 3 月15日
平 6- 87954	C08G 64/30	N P U	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995) 3 月20日	平成 6 年(1994) 3 月29日
平 6-145454	C08L 33/06	L J F	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995) 3 月20日	平成 6 年(1994) 5 月24日
平 6-200257	C10G 1/10		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995)12月12日	平成 6 年(1994) 7 月19日
平 6-220232	C08J 7/04		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成 7 年(1995) 2 月21日 平成 7 年(1995)10月31日	平成 6 年(1994) 8 月 9 日 平成 6 年(1994) 8 月 9 日

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 6-248024	C08F 210/00	M J J	全文訂正後 の公開公報 公開日	平成7年(1995)10月31日	平成6年(1994)9月6日

第3部門(4)

## 正 誤 表

(平成10年9月22日発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 4-210433	C22B 1/16		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)12月6日	平成4年(1992)7月31日
平 4-221084	C23C 28/04		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)8月11日
平 4-224673	C23C 14/32		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)8月13日
平 4-301061	C23C 2/28		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)10月23日
平 5- 70196	C04B 24/04		全文訂正後の公開公報 公開日	平成5年(1993)11月2日	平成5年(1993)3月23日
平 5-209261	C23C 14/06		全文訂正後の公開公報 公開日	平成7年(1995)3月20日	平成5年(1993)8月20日

第3部門(5)

## 正 誤 表

(平成10年9月22日発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 4-209830	D01F 9/145	D B B	全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月29日	平成4年(1992)7月31日
平 4-370266	D06B 23/10		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月15日	平成4年(1992)12月22日
平 5-195450	D06P 5/08		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)12月13日	平成5年(1993)8月3日
平 6-17383	D06P 5/20		全文訂正後の公開公報 公開日	平成7年(1995)12月12日	平成6年(1994)1月25日
平 6-228801	A41B 11/14		全文訂正後の公開公報 公開日	平成7年(1995)11月7日	平成6年(1994)8月16日

第4部門(1)

## 正 誤 表

(平成10年9月22日発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 4-254612	E02D 5/20	1 0 3	全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月15日	平成4年(1992)9月9日
平 4-281996	E21D 9/08		全文訂正後の公開公報 公開日	平成5年(1993)11月2日	平成4年(1992)10月7日
平 5- 18008	E04B 1/343	1 0 1	全文訂正後の公開公報 公開日	平成5年(1993)11月2日	平成5年(1993)1月26日
平 5- 98644	E02D 17/04		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月8日	平成5年(1993)4月20日
平 6- 26049	E02D 17/20	1 0 2	全文訂正後の公開公報 公開日	平成7年(1995)10月31日	平成6年(1994)2月1日
平 6- 26052	E02D 17/20	1 0 2	全文訂正後の公開公報 公開日	平成7年(1995)10月31日	平成6年(1994)2月1日



第5部門(1)

## 正 誤 表

(平成10年9月22日発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 6- 17742	F03B 17/02		全文訂正後の公開公報 公開日	平成6年(1994)11月15日	平成6年(1994)1月25日
平 7- 49080	F03G 7/08		全文訂正後の公開公報 公開日	平成7年(1995)12月12日	平成7年(1995)2月21日

第5部門(2)

## 正 誤 表

(平成10年9月22日発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
平 4-327044	F16F 15/26		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成6年(1994)10月25日	平成4年(1992)11月16日
平 4-331867	F16H 61/14		全文訂正後 の公開公報 公開日	平成5年(1993)11月2日	平成4年(1992)11月19日